

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

***E. coli recG* geeni komplementeerimine**

***S. cerevisiae* IRC3 geeniga**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Arina Šablinskaja

Juhendaja: M.Sc Ilja Gaidutšik

TARTU

2017

***E. coli* recG geeni komplementeerimine *S. cerevisiae* IRC3 geeniga.**

Bakalaureusetöö

Arina Šablinskaja

Lühikokkuvõte. Pärmide mitokondrites leiduv helikaas Irc3 on hädavajalik raku hingamiseks, seega ka mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamiseks. Irc3 on mitokondriaalne DNA harude migratsiooni ensüüm, mis seob ja harutab lahti *Holliday* struktuuri- ja replikatsiooni kahvli-laadseid substraate. Valgu aktiivsuse põhjal pakuti välja, et Irc3p võib oma bioloogilises rollis rakus sarnaneda bakteriaalsele RecG helikaasile. Selle töö eesmärk oli uurida *S. cerevisiae* Irc3p võimet komplementeerida bakteriaalse RecG deletsiooni *E. coli* rakus, edasisteks Irc3p funktsioonide uurimiseks. Tööst selgus, et Irc3p ekspressioon *recG* deletsiooniga *E. coli* tüves osaliselt tõstab rakkude elulemust peale UV töötlust ning mitomütsiin C sisaldaval söötmel võrreldes $\Delta recG$ tüvega, kinnitades, et Irc3p on võimeline osaliselt komplementeerida RecG puudumist.

CERCS teaduseriala: P 320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees.

Märksõnad: Irc3, helikaas, mitokonder, RecG.

Complimentation analysis of *E. coli* recG gene deletion with *S. cerevisiae* IRC3 gene

Bachelor's thesis

Arina Šablinskaja

Abstract. Yeast mitochondrial helicase Irc3 is essential for cellular respiration and thereby is needed for maintenance and stable propagation of *wt* mitochondrial DNA. Irc3 is the mitochondrial DNA strand migration enzyme which binds and unwinds Holliday junctions and replication fork substrates. It was proposed that the Irc3p biological roles in the cell could be similar to bacterial helicase RecG. The aim of this work was to investigate the ability of *S. cerevisiae* Irc3p to complement bacterial *recG* deletion in *E. coli* to further investigate Irc3p functions. Results showed that Irc3p expression in *E. coli* strain with a *recG* deletion partially increases the survival of UV-treated cells and growth on the medium containing mitomycin C, confirming that Irc3p is able to partially complement the loss of RecG.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis.

Keywords: Irc3, helicase, mitochondrion, RecG.

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Helikaasid	7
1.2. SF1 ja SF2 valgud	8
1.3. Bakteriaalne RecG valk	12
1.4. <i>S.cerevisiae</i> mitokondriaalne DNA.....	16
1.5. Pärmis mitokondriaalne Irc3 valk	18
2. MATERJALID JA METOODIKA.....	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Tüved ja vektorid	21
2.3. Praimerid.....	22
2.4. Söötmed ja kasvutingimused	23
2.5. Lahused ja reagensid	23
2.6. <i>E. coli</i> BW25113 ja JW3627-1 tüvede kompetentsete rakkude valmistamine	24
2.7. <i>E. coli</i> transformatsioon <i>kuumašokki</i> meetodiga	24
2.8. Plasmiidse DNA eraldamine <i>E. coli</i> 'st	25
2.9. DNA fenooltöötlus	25
2.10. Gelelektroforees ning DNA eraldamine geelist.....	26
2.11. Preparatiivne PCR.....	26
2.12. Analüütiline PCR	26
2.13. Restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid	27
2.14. Erinevate <i>E.coli</i> tüvede UV tundlikkuse analüüs.....	28
2.15. Erinevate <i>E.coli</i> tüvede mitomütsiin C tundlikkuse analüüs	28
3. TULEMUSED.....	29
3.1. Konstruktide valmistamine	29

3.2. UV mõju uurimine erinevate bakteritüvede elulemusele	31
3.3. Mitomütsiini C mõju uurimine millele	33
4. ARUTELU	35
KOKKUVÕTE	37
SUMMARY	38
KIRJANDUSE LOETELU	39
LISAD	44
Lihtlitsents	46

KASUTATUD LÜHENDID

Ap – aluspaar

ddH₂O – kahekordselt destilleeritud vesi

DSBR – dsDNA katkete reparatsioon

dsDNA – kaheaahelaline DNA

EtOH – etanool

Irc3p – Irc3 valk

MMC – mitomütsiin C

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NH – nukleiinhape

NTP – nukleotiid trifosfaat

p/min – pööret minutis

SF – superperekond

ssDNA – üheaahelaline DNA

UV – ultraviolett kiirgus

wt – metsiktüüp

SISSEJUHATUS

Helikaasid on ensüümid, mis seotud paljude rakuliste protsessidega, nagu DNA reparatsioon, replikatsioon ja rekombinatsioon. Helikaasid on võimelised translokeerima nukleiinhapete peal ning harutama neid lahti. Nukleiinhapete lahti harutamise eesmärk on teha neid kättesaadavaks või sobilikuks teiste valkude jaoks.

Helikaasid klassifitseeritakse konserveerunud aminohappe järjestuste ehk motiivide alusel superperekondadeks, millest suuremad on superperekond 1 ja 2. Mõlematele perekondadele on omased ühised struktuursed jooned nagu RecA-laadsetes domeenides konserveerunud motiivide olemasolu.

E. coli RecG valk on superperekonda 2 kuuluv helikaas. RecG on võimeline siduma ja lahti harutama erinevaid hargnenud DNA struktuure. RecG omab lisaks helikaassele tuumale unikaalset *wedge* domeeni ning on võimeline katalüüsima replikatsiooni kahvli regressiooni ning samuti osaleb ka kaheaahelaliste katkete reparatsioonis.

Helikaase leidub ka tuumast eraldiseisva genoomiga organellides nagu mitokondrid. Pärmis mitokondriaalne Irc3 on samuti superperekonda 2 kuuluv helikaas, mis lokaliseerub mitokondris. Irc3 on vajalik pärmis metsiktüüpi mitokondriaalse DNA säilitamiseks. Irc3 on võimeline siduma ja lahti harutama erinevaid kaheaahelalisi replikatsiooni kahvli-laadseid struktuure ehk omab RecG-ga sarnaseid biokeemilisi omadusi. Potentsiaalselt mõlemad valgud võivad täita sarnast rolli rakus.

Selleks, et paremini mõista Irc3 bioloogilist rolli pärmis mitokondris antud töö käigus analüüsiti *S.cerevisiae* Irc3p võimet komplementeerida bakteriaalse *recG* deletsiooni bakterirakus.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Helikaasid

Helikaasid on evolutsiooniliselt konserveerunud ensüümid, mida leidub viirustes, prokarüootides ja eukarüootides ning need on seotud paljude rakuliste protsessidega (Mackintosh ja Raney, 2006). Defektid helikaaside funktsioonis ja reguleerimata ekspressioon on eukarüootides seostatud mitmete haigustega, kaasa arvatud vähk, arengulised defektid ja neurodegeneratiivsed haigused (Fairman-Williams et al., 2010).

Helikaasid kuuluvad translokaaside subrühma ning on võimelised lahti harutama DNA ja RNA duplekse, kasutades selleks 5'-nukleosiid trifosfaatide (NTP) hüdroolüüsil saadud energiat (Bianco, 2010; Singleton et al., 2007). Helikaasid hüdroolüüsivad NTPd, et liikuda mööda üht kaksikheeliksi ahelat kõrvaldades teise ahela (Manosas et al., 2010). Nende primaarsed aminohappelised järjestused moodustavad konserveerunud piirkondi ja on tuntud helikaasete motiivide nime all. Need motiivid annavad helikaasidele võime seonduda ja hüdroolüüsida NTP-d ning translokeerida nukleiinhapete (NH) peal (Bianco, 2010).

Nukleiinhapete lahti harutamise eesmärk on teha neid kättesaadavaks või sobilikuks teiste valkude jaoks, mis osalevad sellistes protsessides, nagu DNA reparatsioon, replikatsioon, rekombinatsioon, ning kaasa aitama RNA metabolismi protsessides, nagu transkriptsioon, ribosoomi biogenees, translatsioon, RNA splaissing, RNA korrektuur, RNA transport ja RNA degradatsioon (Bianco, 2010, Patel ja Donmez, 2006).

Helikaasid klassifitseeritakse konserveerunud aminohappe järjestuste motiivide alusel superperekondadeks (SF) (Gorbalenja ja Koonin, 1993). Suuremateks perekondadeks on SF1 ja SF2. Mõlemates perekondades on vähemalt 12 konserveerunud motiivi (Fairman-Williams et al., 2010).

Helikaasid võivad spetsialiseeruda DNA-le, RNA-le või mõlemale nukleiinhapele. Tavaliselt superperekonna piires esinevad nii DNA kui RNA helikaase, välja arvatud SF6, mis koosneb ainult DNA helikaasidest (Jankowsky ja Fairman-Williams, 2010).

Minimaalne nõutav oligomeerne olek, mille puhul helikaasid funktsioneerivad, on monomeer. SF1 ja SF2 helikaasid on peamiselt monomeerid või dimeerid, teiste superperekonndade helikaasid on heksameerid (Singleton et al., 2007).

Vajadusel alajaotatakse iga superperekonna piires ensüümid nende mehhanistlike omaduste järgi, ehk translokeerimise suuna, aktiivsuse ja protsessiivsuse järgi. Seda jaotust kasutatakse uute superperekonna liikmete klassifitseerimiseks (Singleton et al., 2007).

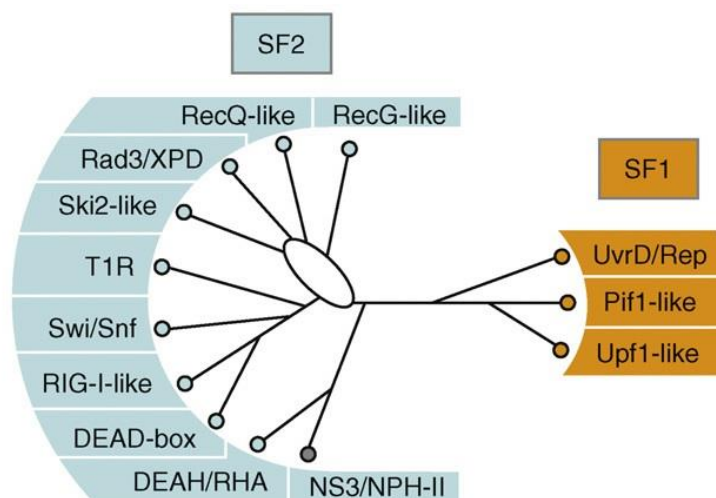
1. Suund: Eristatakse ensüümid, mis liiguvad mööda ssDNA-d (tüüp A) ja dsDNA-d (tüüp B) kas 3'-5' (tüüp α) või 5'-3' (tüüp β) suunas (Singleton et al., 2007, Wu ja Spies, 2012).
2. Protsessiivsus: protsessiivne ensüüm katalüüsib mitu tsüklit enne produkti vabastamist, distributiivne ensüüm teeb mõned katalüütilised tsüklid ja seejärel vabastab produkti enne uue substraadiga taasseondumist. Paljude helikaaside protsessiivsus on reguleeritud läbi interaktsiooni teiste valkudega (Singleton et al., 2007).
3. Aktiivsus: Aktiivne helikaas otseselt interakteerub dupleksiga destabiliseerides seda ja harutades lahti nukliinhapet. Seevastu passiivse helikaas ootab ahelate termilist lahti sulamist selleks, et liikuda edasi. Suurem osa helikaase demonstreerivad vahepealset käitumist (Manosas et al., 2010).
4. Sammu suurus: Oleneb kui palju aluspaari on translokeeritud ja/või lahti harutatud ühe tsükli jooksul, mis on ühe ATP hüdrolüüs (Singleton et al., 2007).

1.2. SF1 ja SF2 valgud

SF1 ja SF2 on kõige suuremad helikaaside perekonnad (Singleton ja Wigley, 2002). Mõlemates perekondades esineb nii α kui β polaarsust (Singleton et al., 2007).

SF1 helikaasid suudavad translokeerida enamasti piki üheaahelalise nukleiinhappe ja SF2 helikaaside perekonnas esinevad valgud, mis suudavad translokeerida piki üheaahelalise või kaheaahelalise või mõlema nukleiinhape tüübi peal. Mõlemad SF harutavad lahti DNA-d läbi *inchworm* mehhanismi, etapiviisiliselt, nii et rohkem samme on vaja, et harutada lahti pikema dupleksi. Helikaasidel on mitu NH seundumissaiti. Ensüüm ei liigu piki ahelat kui ühtne tervik. Seda teevad ensüümi erinevad domeenid protsessi erinevatel ajahetkedel (Singleton ja Wigley, 2002; Raney et al., 2012; Mackintosh ja Raney, 2006).

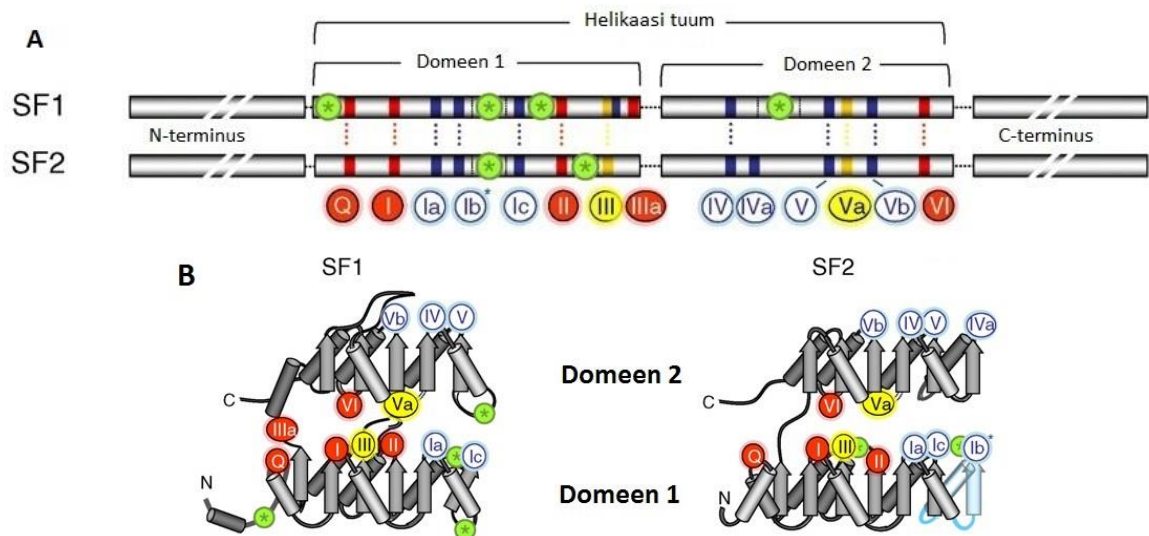
Põhinedes järjestuste homoloogiale SF1 ja SF2 on jagatud mitmeteks perekondadeks (Joonis 1) (Fairman-Williams et al., 2010).



Joonis 1. SF1 ja SF2 helikaaside perekonnad. SF2 koosneb üheksast perekonnast ja ühest ensüümide rühmast (NS3/NPH-II) (vasakul) ja SF1 kuulub kolm helikaaside perekonda (paremal) (Fairman-Williams et al., 2010).

Kõige märgatavamaks SF1 ja SF2 helikaaside ühiseks jooneks on konserveerunud motiivid, millest vähemalt 12 leidub mõlemates SF-des. Mõlemate perekondade konserveerunud helikaassed motiivid on koondatud kahte RecA-laadsesse domeeni (domeen 1 ja domeen 2), mida nimetatakse ka helikaasseks tuumaks (Joonis 2A ja 2B). Need domeenid on kaasatud ATP seondumises ja hüdroolüüsis, ning nukleiinhapete sidumises ja lahti harutamises (Wu ja Spies, 2012; Raney et al., 2012; Fairman-Williams et al., 2010). Helikaasses tuumas võivad asuda ka täiendavad domeenid (Joonis 2A), mis võivad määrata ensüümi spetsiifilisuse ning suunavad osalema konkreetses rakulises protsessis. Ilma nende domeenideta ensüümi helikaasne tuum on lihtsalt võimeline translokeerima piki NH ilma ahelate lahti harutamiseteta. Arvatakse, et need struktuurid on vajalikud ka selleks, et ensüüm kompleks seostuks DNAGA õigesti (Singleton ja Wigley, 2002).

Lisadomeenide üheks näideks on SF2 kuuluva ensüümi UvrB pikendatud β -juuksenõela struktuur. Autorid oletavad, et juuksenõela struktuur siseneb DNA dupleksi kahe ahela vahele ning võib stabiliseerida ka osaliselt lahti harutatud dupleksi. (Machius et al., 1999; Theis, et al., 1999; Singleton ja Wigley, 2002).

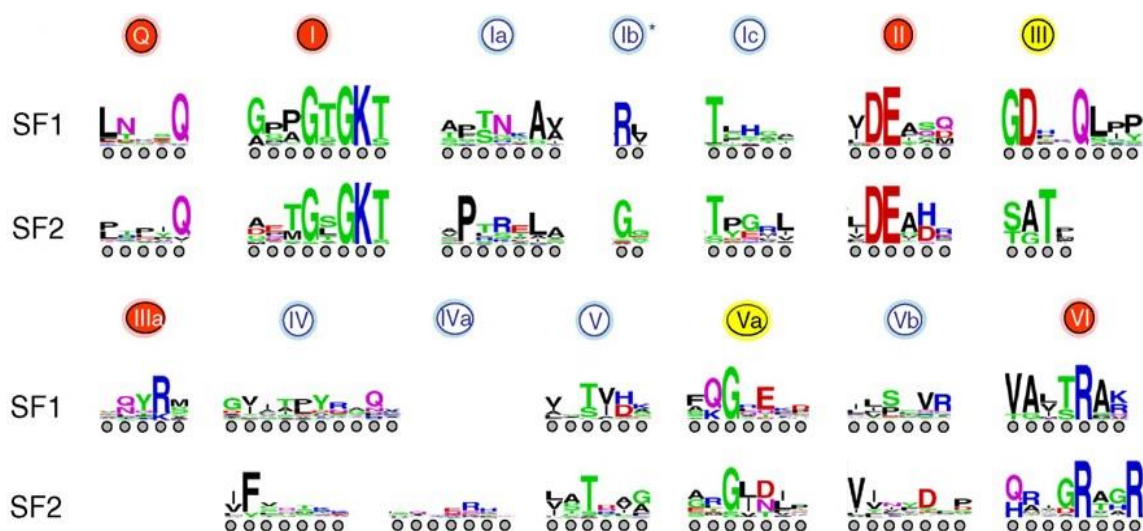


Joonis 2. (A) SF1 ja SF2 helikaaside tuumas paiknevad motiivid. Motiivid on värvitud vastavalt nende biokeemilisele funktsioonile. Punane: NTP seondumine ja hüdrolüüs; kollane: koordineerimine nukleiinhappe sidumissaitide ja NTP hüdrolüüsi saitide vahel; sinine: NH seondumine; rohelisega on märgitud lisadomeenide insertioonikohad. Motiiv IIIa esineb SF1 ja puudub suuremal osal SF2 ensüümidel (modifitseeritud Fairman-Williams et al., 2010). (B) Konserveerunud motiivide asetus helikaasse tuuma RecA-laadsetes domeenides. β -lehed on kujutatud nooltega ja α -heeliksid silindritega. Motiivide positsioonid on märgistatud rooma numbritega. Sinine värvus parempoolsel β -lehed ja α -heeliksil superperekonnas 2 näitab, et mõnedes SF2 perekondades võib see osa puududa. Motiivid on värvitud vastavalt nende biokeemilisele funktsioonile nagu joonise A osal (Fairman-Williams et al., 2010).

Motiivide arv ja nende järjestuste konserveerumine superperekondade ja perekondade piires varieerub ning ainult piiratud arv konserveerunud järjestusi jääb mõlemas superperekonnas muutumatuna, mis viitab nende olulisusele. Kõrgeima konserveerumise tasemega järjestused mõlemas superperekondades on motiivides I, II ja VI. **Motiiv I** ehk **Walker A** esineb paljudes nukleotiidi siduvates valkudes ja moodustab fosfaati-siduva aasa. Glütsiin-lüsiin-treoniin (GKT) järjestus (Joonis 3) on vajalik valgu intekaktsiooniks Mg^{2+} ja ATPga. **Motiiv II** ehk **Walker B** motiiv on seotud NTP hüdrolüüsiga (Fairman-Williams et al., 2010). Aspargiinhappe ja glutamiinhappe (DE) jäägid (Joonis 3) koordineerivad ATP-ga seotud Mg^{2+} ja vastavalt aktiveerivad ründava vee molekuli. Nende jääkide mutatsioonid vähendavad või lausa inhibeerivad ATPasse ja helikaasse aktiivsuse (Fairman-Williams et al., 2010; Raney et al., 2012).

Motiiv VI osaleb NTP seondumises ja hüdroolüüsis, motiivi VI aminohappeliste jääkide muutmine põhjustas mitmetes helikaasides nukleiinhape sidumise defekte (Fairman-Williams et al., 2010; Raney et al., 2012). **Q motiiv** on samuti oluline ATP sidumiseks (Raney et al., 2012) ning puudub DEAH/RHA ja NS3/NPH-II valkudes (SF2) kuna need ensüümid ei ole spetsiifilised ATP-le (Fairman-Williams et al., 2010).

Motiivid III ja Va osalevad NTP ja nukleiinhappe siduva saiti vahelises koordinatsioonis. Mõlemas superperekonnas III ja Va motiivide järjestused on erinevad (Joonis 3). Erinevused vihjavad sellele, et kommunikeerimine NTP ja nukleiinhapet siduva saitide vahel võib varieeruda SF1 ja SF2 vahel. (Fairman-Williams et al., 2010; Singleton et al., 2007). **Motiivid Ia–c, IV, IVa, V, Vb** seostuvad nukleiinhappega ja tõenäoliselt samuti osalevad kommunikeerimisel nukleiinhappe ja NTP sidumissaidi vahel (Fairman-Williams et al., 2010). On pakutud, et SF1 helikaasides (UvrD, Rep, Pif1), motiivid Ia ja III omavad olulist rolli translokatsiooni polaarsuse määramisel. (Raney et al., 2012; Fairman-Williams et al., 2010).



Joonis 3. SF1 ja SF2 helikaasete motiivide konserveerumine. Tähtede kõrgus näitab aminohappejäägi konserveerumise taset. Q-motiiv on mõnevõrra vähem konserveerunud mõlemas SFs. Kõrgeima konserveerumise tasemega järjestused on motiivides I, II ja VI, mis koordineerivad trifosfaatide sidumise ja hüdroolüüsi (Fairman-Williams et al., 2010).

Enamikus SF1 ja SF2 helikaasides on helikaasne tuum ümbritsetud kas C-terminaalsete ja/või N-terminaalsete domeenidega (Joonis 2A), mis ületavad sageli helikaasse tuuma suurust. C-terminaalsed ja N-terminaalsed domeenid tavaliselt ei ole konserveerunud perekonna piires ja paljudel juhtudel sisaldavad endas spetsiifiliste funktsioonidega lisastruktuure, nagu

nukleaasid, RNA või DNA sidumisdomeenid (nt Zn-sõrme, OB-voldide, dsRBDs) või valk-valk interaktsioonidesse kaasatud domeene. Terminaalsed domeenid mõjutavad või isegi määravad helikaaside funktsioone lisades ensümaatilise aktiivsuse. On demonstreeritud, et need suunavad seondumisele teatud kompleksitega, et soodustada interaktsiooni teiste valkudega või kergendada spetsiifiliste nukleiinhappe piirkondade äratundmist (Fairman-Williams et al., 2010).

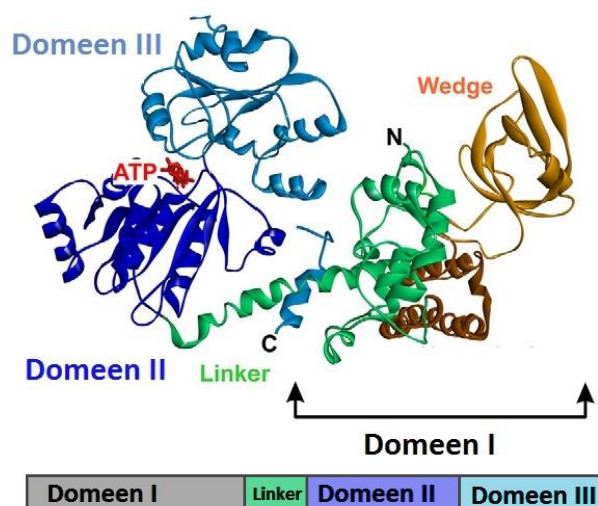
1.3. Bakteriaalne RecG valk

Escherichia coli 2082 bp pikkune *recG* geen kodeerib RecG valgu suurusega 76,43 kDa. RecG on 3'-5' polaarsusega monomeerne DNA helikaas, mida esineb 7 molekuli raku kohta. Valk esineb peaaegu kõikides bakterites ning hiljuti on leitud ka taimede organellides (Bianco, 2015; Odahara et al., 2015; Wallet et al., 2015).

recG inaktiveerimine rakus põhjustab tundlikkust DNA kahjustavale agendile mitomütsiin C-le, kerget tundlikkust ultravioletti kiirgusele (UV) ja samuti ioniseeriva kiirgusele (Lloyd ja Buckman, 1991; Lloyd, 1991). Erinevate *ruvABC* süsteemi komponentide ja *recG* topelt mutantidel on märgatud UV ja ioniseeriva kiirgusele tundlikkuse suurenemise ja madalamat rekombinatsiooni efektiivsust pärast konjugatsiooni või transduktsiooni võrreldes üksik mutantidega. (Lloyd, 1991).

Helikaasete motiivide alusel klassifitseeriti RecG Superperekonda 2 (Gorbalenja ja Koonin, 1993; Singleton et al., 2007, 2001; Lloyd ja Rudolph, 2016). RecG koosneb kolmest struktuursest domeenist. Homoloogia DNA helikaasidega piirdub C-terminaalse valgu poolega, kus paiknevad helikaasseid motiive sisaldavad RecA laadsed domeenid 2 ja 3 (Joonis 4), mis annavad võimet seonduda ja hüdrolüüsida NTPd ja kasutada kaasnenud konformatsioonilised muutused töö alustamiseks. (Bianco, 2015; Singleton et al., 2001).

Lisaks domeenidele 2 ja 3, sisaldab valgu N-terminaalne pool *wedge* domeeni (Joonis 4), mis on ühendatud domeenidega 2 ja 3 α -heeliks linkeriga kaudu (Joonis 4) ja on leitud ainult RecG valkudes. See domeen vastutab hargnenud struktuuridega seostumise eest (Singleton et al., 2001). Valk on suunatud *wedge* domeeniga replikatsiooni kahvli poole nii, et *wedge* domeen paikneb kahvli harude kohal.

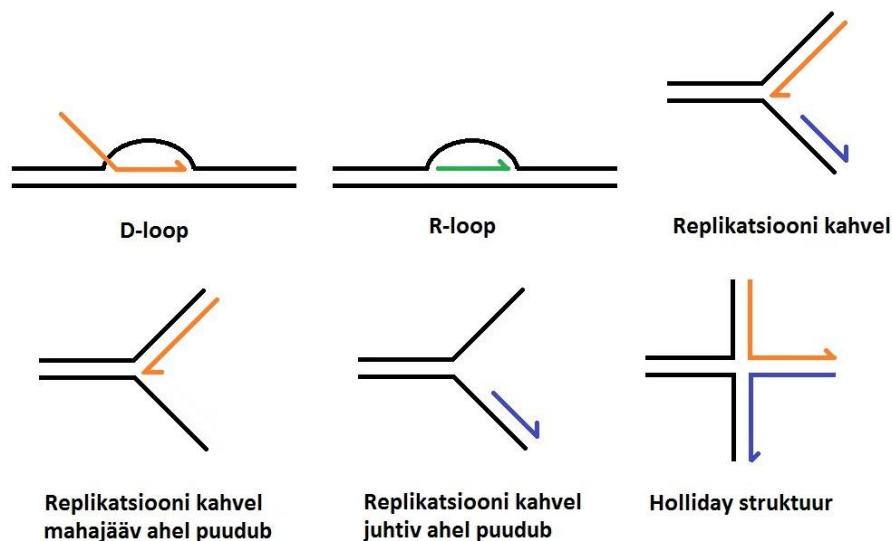


Joonis 4. Üleval on joonistatud *T. Maritima* RecG kristallstruktuur, kus võib näha kolme valgudomeeni. Domeenis 1 on kollasega näidatud *wedge* domeen. Pruuniga on märgitud N-terminaalne pikendus, mis on omane ainult *T. Maritima* RecG valgujärjestusele. Domeenide 2 ja 3 vahel on seondunud ATP molekul (punane). Domeen 1 on ühendatud domeeniga 2 ja 3 α -heeliks linkeri kaudu. (modifitseeritud Bianco ja Lyubchenko, 2017). Allpool on toodud valgugraafiline skeem.

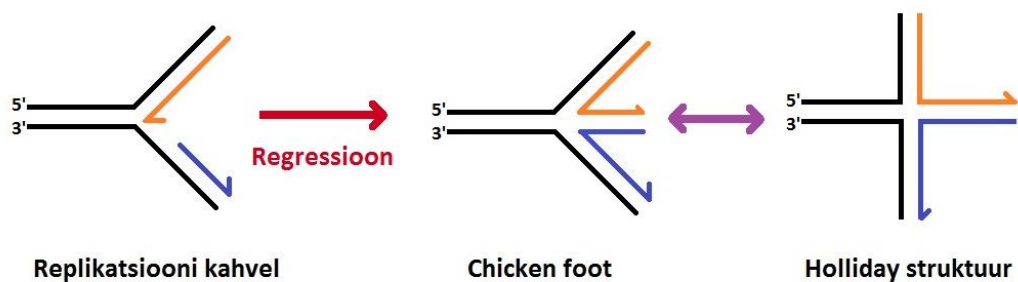
RecG interaktsioon DNA dupleksiga on vahendatud läbi *wedge* domeeni ja pikendatud β -juuksenoela struktuuri (TRG motiivi). Hargnenud DNA molekul haaratakse nende valgudomeenide vahele ning harutatakse lahti (Singleton et al., 2001). TRG motiiv (translocation by RecG) asub *wedge* ja helikaasse domeeni vahel. RecG omab unikaalset translokatsiooni tänu TRG motiivile, mis samuti soodustab hargnenud molekulide lahti harutamise, moodustades spiraalse juuksenoela motiivi. Mutatsioonid TRG motiivis häirivad *Holliday* struktuure ja kahvlilaadsed struktuure lahti harutamist *in vitro* (Mahdi et al., 2003).

RecG valgul esineb dsDNA-ga stimuleeritud ATPaasne aktiivsus. *In vitro* RecG on võimeline siduma ja lahti harutama erinevaid hargnenud DNA substraate, sealhulgas *Holliday* struktuure, D-loope, R-loope ja erinevaid replikatsiooni kahveleid modelleerivaid struktuure (Joonis 5) (Singleton ja Wigley, 2002; Singleton et al., 2001; Lloyd ja Rudolph, 2016; Bianco, 2015). RecG harutab lahti DNA-d translokeerides, eelistades dsDNA ahelaid. RecG harutab lahti nii juhtiva kui mahajääva ahela sisaldavaid seiskunud replitsiooni kahveleid *in vitro*, aga eelistab siiski mahajääva ahelaga kahveleid rohkem (Singleton ja Wigley, 2002). RecG ensümaatilise aktiivsuse eripära seisneb selles, et samaaegselt lisaks DNA dupleksite lahti harutamisele, RecG katalüüsib ka juhtiva ja mahajääva ahelate kokkusulamist, mis on

replikatsiooni kahvli regressiooni põhisammuks (Joonis 6) (Bianco, 2015; Lloyd ja Rudolph, 2016).



Joonis 5. Hargnenud DNA molekulide struktuurid. Juhtivad ahelad on värvitud oranžiks ja mahajäävad ahelad siniseks. Rohelisena on kujutatud RNA ahel.



Joonis 6. Replikatsiooni kahvli regressiooni mehhanism. Juhtiv ahel on värvitud oranžiks ja mahajääv ahel on sinine. Regressiooni käigus liigub replikatsiooni kahvel DNA kahjustusest eemale, regiooni, kus DNA on kahjustamata ning selle tulemusena moodustub “chicken foot” struktuur, mis struktuurselt meenutab Holliday struktuuri.

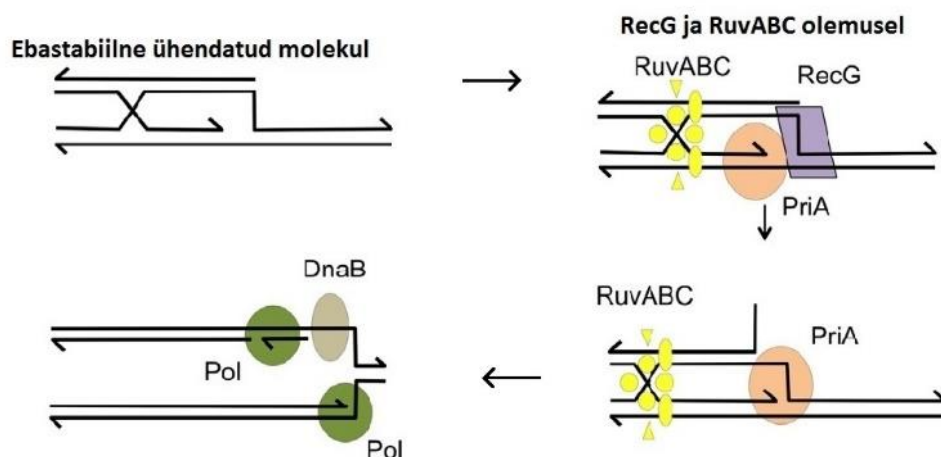
DNA ahelate kahjustuste tõttu võib replikatsiooni kahvel seiskuda ja laguneda. Regressiooni on vaja selleks, et liigutada replikatsiooni kahvlit DNA kahjustuse saidist eemale, regiooni, kus DNA on kahjustamata (Joonis 6). See võimaldab reparatsioonis osalevatele valkudele liigipääsu kahjustusele, kergendades vigade parandamist ning on vajalik rekombinatsiooni või replikatsiooni taaskäivitamise alustamiseks. Replikatsiooni kahvli regressiooni lõpptulemuseks võib pidada Holliday struktuuri. (Bianco, 2015; Manosas et al., 2013; Bianco ja Lyubchenko, 2017). Kuna *ruvABC* süsteemi komponentide ja *recG* topelt mutantidel on

märgatud UV ja ioniseeriva kiirgusele tundlikkuse suurenemist, siis oletati esialgu, et RecG ja RuvABC katalüüsivad alternatiivsed sammud rekombinatsiooni rajas, kus mõlemad võtavad osa replikatsiooni kahvlite regressioonis (Lloyd, 1991). Kuigi RecG katalüüsib väga edukalt kahvli regressiooni *in vitro*, tõendid sellise RecG aktiivsuse kohta *in vivo* puuduvad (Azeroglu ja Leach, 2017; Lloyd ja Rudolph, 2016).

Rakus täidab RecG erinevaid funktsioone DNA reparatsioonis ja rekombinatsioonis. Uuringud on jõudnud järeldusele, et RecG võib kaitsta bakteri genoomi, piirates replikatsiooni initsiatsiooni oriC regiooniga ja taaskäivitada replikatsiooni taastatud replikatsiooni kahvlites (Rudolph et al., 2010).

Viimased uuringud jõudsid järeldusele, et *in vivo* võib RecG osa võtta dsDNA katkete reparatsiooni (DSBR= DNA double-strand break repair) käigus moodustunud ühendatud molekulide (joint molecules) stabiliseerimises ja DNA amplifikatsiooni reguleerimises. RecG puudumisel on täheldatud DNA kahjustuse järgset patoloogilist DNA üle-replikatsiooni (Azeroglu ja Leach, 2017).

Katsete põhjal saadud mudeli järgi PriA, RecG ja RuvABC interakteeruvad selleks, et stabiliseerida ühendatud molekule DSBR ajal (Joonis 7). (Azeroglu et al., 2016; Azeroglu ja Leach, 2017).



Joonis 7. Ühendatud molekuli stabiliseerimine RuvABC ja RecG-ga. RuvAB teostab Holliday struktuuri migratsiooni DSBR saidist eemale ja RuvC subühik lõikab seda lahti. RecG manipuneerib replikatsiooni kahvli D-loopi otsad nii, et moodustunud 3' ots saaks seostuda PriA. PriA initsieerib DnaB seostumist ja replikatsiooni taasalgustamist. RuvABC ja RecG osalusel D-loopi replikatsiooni kahvli otsad ja Holliday struktuur on stabiliseeritud (modifitseeritud Azeroglu ja Leach, 2017).

RuvA, RuvB ja RuvC *Escherichia coli* valgud mängivad tähtsat rolli homoloogilises rekombinatsioonis ja kahjustatud DNA rekombinantiivses parandamises. RuvA on spetsiifiline faktor, mis suunab RuvB kindlale kohale ahelas kus RuvB teostab harude migratsiooni. RuvA ja RuvB moodustavad kompleksi, mis stimuleerib *Holliday* struktuuri ühenduskohtades ATP-sõltuva harude migratsiooni. RuvC on endonukleas, mis lõikab *Holliday* struktuuri kehtestades *nick*'id kahe DNA ahelatesse. Need kolm valku interakteeruvad omavahel ja moodustavad RuvABC kompleksi (West, 1997).

PriA on oluline valk, mis initsieerib seiskunud replikatsiooni kahvli taaskäivitamist. PriA tunneb ära ja seondub replikatsioonikahvli D-loopi 3' otsaga, mis on moodustunud RecG abil ning laeb replikatiivse helikaasi DnaB mahajääva ssDNA regioonile replikatsiooni taaskäivitamiseks (Marians, 2000). Sama eesmärki täidab PriA DSBR ajal moodustunud molekulide stabiliseerimisel. PriA ja RecG omavaheline koostöö on hädavajalik, kuna RecG puudumisel PriA ja DnaB võivad olla valesti paigutatud replikatsiooni kahvlil ning see võib viia patoloogilisele DNA amplifikatsioonile (Azeroglu ja Leach, 2017).

Hiljuti on avastatud, et RecG võib interakteeruda üksikahelat siduva valguga SSB, et saada liigipääsu replikatsiooni kahvlile. See interaktsioon toimub RecG *wedge* domeeni ja SSB sisemiselt korrastamata linkeri (intrinsically disordered linker, IDL) kaudu, mis arvatavasti on vajalik õigeaegseks RecG paigutamiseks replikatsiooni kahvlile. Peale RecG-t seondub SSB ka teiste rekombinatsioonis ja reparatsioonis osalevate bakteriaalsete valkudega, mida teatakse „SSB-interaktoomi” nime all. Nende valkude hulka kuulub näiteks PriA ja RecQ DNA helikaasid (Bianco 2015, Bianco ja Lyubchenko, 2017).

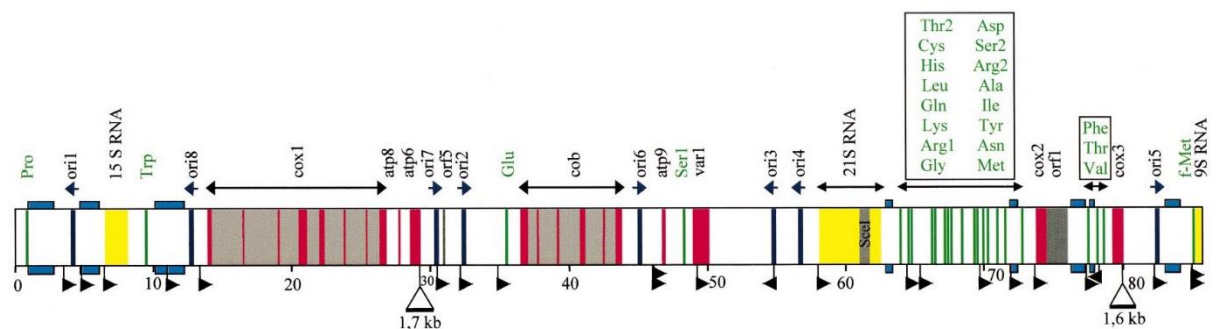
Kõige tõenäolisem on see, et RecG on seotud DSBR käigus moodustunud ühendatud molekulide stabiliseerimisega, aga ei tasu välistada täielikult tema osalust replikatsiooni kahvli regressioonis (Azeroglu et al., 2016; Azeroglu ja Leach, 2017).

1.4. *S.cerevisiae* mitokondriaalne DNA

Mitokonder varustab raku energiaga oksüdatiivse fosforüleerimise kaudu, omab keskset rolli aeroobses hingamises ning võtab osa ka mitmetes teistes rakuprotsessides. *S. cerevisiae* on enam kasutatav mudelorganism mitokondriaalsetes uuringutes (Chen ja Butow, 2005).

Üheks mitokondri eripäraks on tema enda oma genoom. See kodeerib kolme hingamisahela kompleksi seitset põhikomponenti: kompleksi III (apotsütokroom b, mida kodeerib COB geen), kompleksi IV (tsütokroom c oksüdaasi subühikud I, II ja III, kodeeritud COX1, COX2 ja

COX3 vastavalt geenides) ja kompleksi V (mitokondriaalse ATP süntaasi F_0 komponenti subühikud 6, 8 ja 9, kodeeritud ATP6, ATP8 ja ATP9 geenide poolt). Lisaks pärmi mitokondriaalne genoom kodeerib mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku polüpeptiidi Var1 (Butow et al., 1985; Mason et al., 1996; Seraphin et al., 1987) ning 21S ja 15S ribosomaalsed RNA-d, 24 tRNA-d ja RNAaas P komponent 9S RNA (Joonis 8) (Hollingsworth ja Martin, 1986). Mitokondrite genoom sisaldab seitse kuni kaheksa replikatsiooni origini-laadseid (*ori*) elemente, mis on kaasatud mitokondriaalse genoomi replikatsiooni. *Ori* järjestused võivad samuti toimida kui transkriptsiooni initsiatsiooni saidid (Bernardi, 2005).



Joonis 8. *S. cerevisiae* tüve FY1679 lineariseeritud mitokondriaalse genoomi kaart. Punasega on märgitud valku kodeerivate geenide eksonid; halliga intronid ja intronitega seotud lugemisraamid; rohelisega tRNA; kollasega 9S, 15S ja 21S rRNA; tumesinisega *ori* elemente; kolmnurgad näitavad transkriptsiooni initsiatsiooni saidid ja nende orientatsiooni; suured kolmnurgad tähistavad deletsioone (Foury, 1998).

Ainult ~ 1% mitokondriaalsetest valkudest on kodeeritud mitokondriaalse genoomi poolt ja sünteesitud maatriksis ning enamik mitokondriaalseid valke on kodeeritud tuuma genoomis ning transporditud mitokondrisse (Schmidt et al., 2010).

Keskmiselt kuni ~ 15% *S. cerevisiae* DNA-st on mitokondriaalne DNA (mtDNA). Seda esineb umbes 50 koopiad haploidse raku kohta. mtDNA molekulid on pakendatud erineva arvu mitokondritesse, esinevad väikeste klastritena ehk nukleoididena, nende suurus ja arv varieeruvad sõltuvalt füsioloogilistest tingimustest. *S. cerevisiae* mtDNA on lineaarne, hargnenud ning esineb konkatemeeridena ja ~85-150 kb pikk (lineaarse monomeri pikkus ~85,8 kb), aga väikestes kogustes esineb ühe genoomi pikad tsirkulaarsed vormid, mis on viinud järeldusele, et replikatsioon võiks toimuda veereva ratta mehhanismi järgi (Williamson, 2002; Chen ja Butow, 2005).

Pärmi mitokondriaalse genoomi tuntakse *rho* faktorina ja tähistatakse kreeka tähega ρ . Metsiktüüpi pärmirakke, mis hingavad normaalselt ja moodustavad suuri kolooniaid tähistatakse ρ^+ . *Petite* mutantide (ρ^0 ja ρ^-) hingamine on puudulik, aga nad võivad kasvada kääritatavatel süsinikuallikatel ja moodustuda väikesi kolooniaid, millest tulenebki sõna *petite*. Nende mitokondriaalne DNA on kas täielikult kadunud (ρ^0) või koosneb järelejäänud ρ^+ genoomi fragmentidest (ρ^-) (Williamson, 2002).

Täpne mtDNA replikatsiooni mehhanism pärmis on veel suuresti teadmata ja mudelid on tuletatud kaudsetest geneetilistest tõenditest. Kõike valke, mis on kaasatud mtDNA replikatsiooni, parandamise ja muudesse genoomi säilitamise protsessidesse pole veel lõplikult teada. On täheldatud, et mitokondriaalse DNA säilitamisega (kuid mitte ainult) seotud geenide deleteerimine põhjustab rakkudes enamasti hingamisvõime kaotamist ning ρ^- või ρ^0 fenotüüpi. Näiteks tüvedes, kus puudub MIP1, mitokondriaalse polümeraasi kodeeriv geen kaovad kõik mtDNA koopiad (rakud muutuvad ρ^0) (Lipinski et al., 2010; Chen ja Butow, 2005).

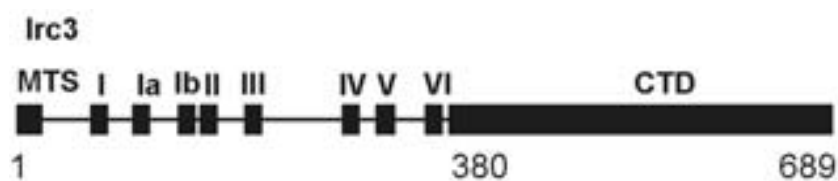
1.5. Pärmis mitokondriaalne Irc3 valk

Irc3 valk (Irc3p) on tuumas kodeeritud 75,6 kDa suurune dsDNA-sõltuv SFII helikaas, mis lokaliseerub pärmis *Saccharomyces cerevisiae* mitokondrite maatriksisse. IRC3 deletsioon põhjustab hingamisvõime kadumist, mis on tingitud metsiktüüpi (ρ^+) mtDNA kadumisega (Sedman jt., 2014). Lisaks, DNA metaboliitide analüüs ρ^- ja metsiktüüpi $\Delta irc3$ tüvedes näitas dsDNA katkete teket ning hargnenud DNA struktuuride moodustumise inhibeerimist. See viidab sellele, et Irc3p on oluline pärmis metsiktüüpi mtDNA stabiliseerimisel, arvatavasti dsDNA katkete parandamisel või DNA replikatsioonil rekombinatsiooni teel (Sedman jt., 2014; Gaidutšik jt., 2016).

Irc3 valgu puudumine mõjutas aktiivselt transkribeeritud piirkondi nii ρ^+ , kui ka ρ^- mtDNA-s, näidates et Irc3 võib osaleda ka transkriptsiooni ja replikatsiooni kokkupõrgete tulemustel ilmnunud dsDNA katkete elimineerimises (Sedman et al., 2014).

Valgu 28 esimest N-terminaalset aminohappejääki moodustavad mitokondriaalse transpordi signaali (MTS). Irc3 valgu järjestus sisaldab konserveerunud motiive I-VI helikasses tuumas, mis koosneb kahest RecA-laadsest domeenist (Sedman et al., 2014). Irc3 C-terminaalne CTD domeen on konserveerunud erinevates pärmides ning on võimeline hargnenud DNA

molekule siduma, arvatavasti määrates Irc3 valgu substraadi spetsiifikat (Biokeemia õppetool, avaldamata andmed) (Joonis 9).



Joonis 9. Irc3p skemaatiline ehitus. Joonisel on N-terminuses mitokondriaalseks transpordiks vajalik signaal (MTS) ja C-terminaalne domeen CTD, nende vahel on RecA-laadsetesse domeenidesse paigutatud helikaarsed motiivid I–VI (Sedman et al., 2014).

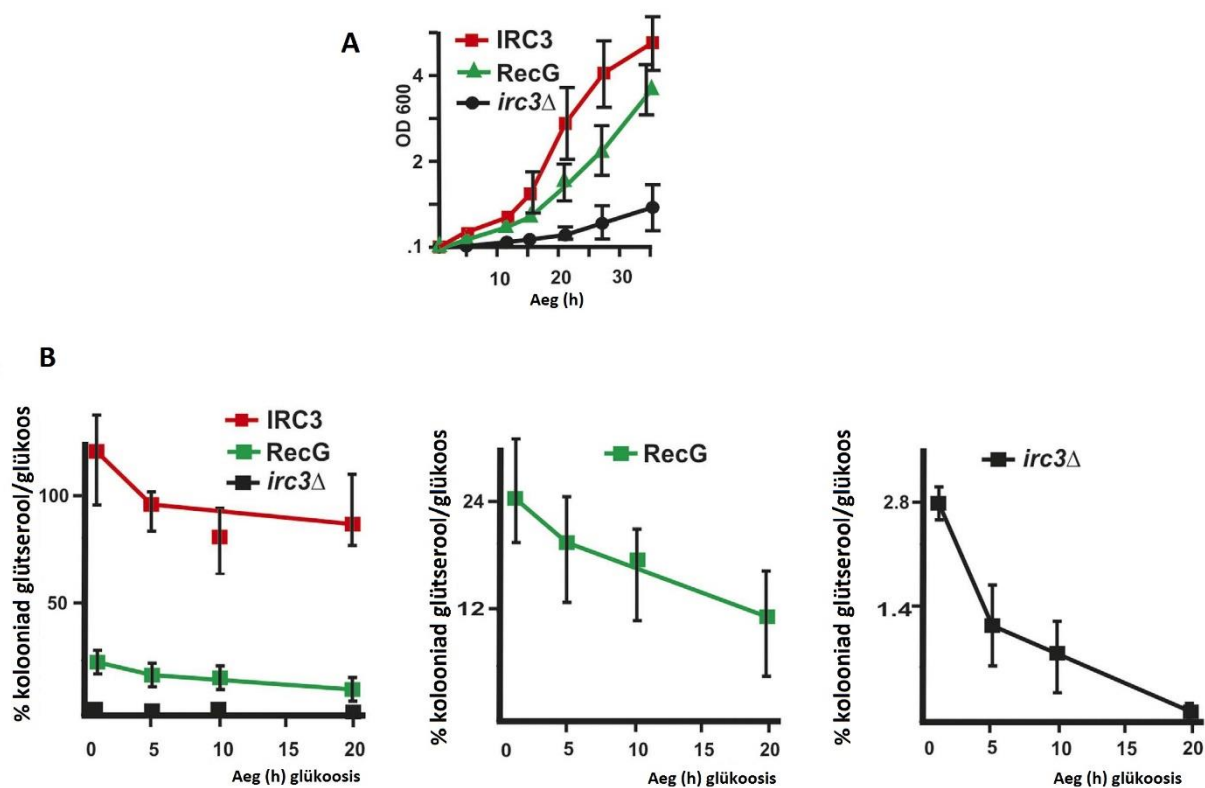
In vitro katsed näitasid, et Irc3p ATPaas on stimuleeritud dsDNA-ga. Irc3 suudab siduda ja lahti harutada erinevaid kaheahelalisi replikatsiooni kahvlit imiteerivaid substraate millel on, kas mahajääv või juhtiv ahel, samuti suudab teostada replikatsiooni kahvli regressiooni ja *Holliday* struktuuri harude migratsiooni (Joonised 5 ja 6). Irc3p ei harutanud lahti lineaarseid DNA substraate, tõmp, 5' või 3' väljaulatuvate üheaahelaliste regioonidega või hargnenuid DNA struktuure (Gaidutšik et al., 2016).

Irc3 valgu lähim homoloog (väljaspool pärme, kus esinevad teised Irc3 ortoloogid) on T4 bakteriofaagi UvsW helikaas, mis samuti kuulub superperekonda 2 ja katalüüsib 3'-5'suunalise hargnenud DNA struktuuride lahti harutamist ning nagu RecG omab olulist rolli seiskunud replikatsiooni kahvlite regressioonis. (Gaidutšik et al., 2016; Nelson ja Benkovic, 2007; Long ja Kreuzer, 2009) UvsW helikaas on samuti ka RecG valgu funktsionaalne analoog, mis on võimeline komplementeerima mõned $\Delta recG$ defektid (Carles-Kinch et al., 1997).

RecG komplementeerib osaliselt Irc3 kaotust. Irc3 biokeemilise aktiivsuse ja RecG biokeemilise aktiivsuse vahel on mitu sarnasust, nii substraadi spetsiifilisuse kui ka aktiivsuste (harude migratsioon, replikatsiooni kahvli regressioon) poolest (Gaidutšik et al., 2016). Kuigi Irc3 ja RecG biokeemilised aktiivsused paistavad olema sarnased, kuuluvad valgud erinevatesse SF2 harudesse ja nende valkude struktuursete domeenide paigutus on ka erinev.

Komplementatsiooni katsed *irc3Δ* pärmi tüvedes näitasid, et mitokondrisse suunatud RecG parandas osaliselt *irc3Δ* pärmirakkude kasvu glütseroolil, kuid mitte metsiktüüpi tasemeni. Lisaks, parandas RecG osaliselt hingamisvõimet, ehk stabiliseeris funktsionaalse

mitokondriaalse genoomi *irc3Δ* tüvedes suutes kas või osaliselt täita Irc3 rolli pärmis mitokondris (Joonis 10) (Gaidutšik et al., 2016).



Joonis 10. Δ irc3 komplementatsioon mitokondrisse transporditud RecG valguga. (A) Pärmirakkude kasvukõverad SC-Leu söötmes, mis sisaldas süsinikuallikana 3% glütserooli. Δ irc3+IRC3 - punased ruudud; Δ irc3+RecG - rohelised kolmnurgad; Δ irc3+kontroll plasmiid - mustad ringid. (B) Pärmirakkude respiratoorse kompetentsuse kaotus kasvatamisel glükoosi sisaldaval söötmel. Parempoolsed joonised on Δ irc3+RecG ja Δ irc3 tüve elujõulisus on näidatud kasutades y-telje skaala suurendust (modifitseeritud Gaidutšik et al., 2016).

2. MATERJALID JA METOODIKA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli kontrollida *S. cerevisiae* IRC3 geeni võimet komplementeerida *E. coli* *recG* geeni deletsiooni *E. coli* bakterirakkudes.

2.2. Tüved ja vektorid

Tabel 1. Töös kasutatud tüved

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
<i>E. coli</i> tüved		
DH5α	F ⁻ , Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ <i>thi</i> -1, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	<i>Bethesda Research Laboratories</i> , 1986, (Hanahan, 1983).
BW25113 (wt)	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph</i> -1, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	<i>Keio collection</i> ; algtüvi, (Baba et al., 2006)
BW25113 (wt) +pJBLacI	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph</i> -1, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> , pJBLacI	Käesolev töö
JW3627-1 (Δ <i>recG</i>)	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph</i> -1, Δ <i>recG</i> 756::kan, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	<i>Keio collection</i>
JW3627-1 +pJBLacI- <i>recG</i> (Δ <i>recG</i> +pJBLacI- <i>recG</i>)	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph</i> -1, Δ <i>recG</i> 756::kan, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> ; pJBLacI-RecG	Käesolev töö

JW3627-1 +pJBLacl-Δ28IRC3 (ΔrecG +pJBLacl-Δ28IRC3)	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, rph-1, ΔrecG756::kan, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514; pJBLacl-Δ28IRC3	Käesolev töö
JW3627-1 +pJBLacl tac (ΔrecG +pJBLacl tac)	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, rph-1, ΔrecG756::kan, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514; pJBLacl tac	Käesolev töö

Tabel 2. Töös kasutatud vektorid

Plasmiid	Genotüüp	Päritolu
pJBLacl tac	IPTG-ga indutseeriv tac promooter, T1T2 transkriptsiooni terminaatorid rrnBT1T2, bla ampitsilliiniresistentsuse geen, trfA kodeerib plasmiidi replikatsiooni initsiatsiooni valgu, lacI laktoosi operoni repressor.	TÜMRI geneetika õppetool
pJBLacl- <i>recG</i>	<i>recG</i> insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö
pJBLacl-Δ28IRC3	Δ28IRC3 insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö

2.3. Praimerid

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus	Eesmärk töös
prtac	5' - AAT TAA TCA TGG GCT CGT ATAA	Sekveneerimine, koloonia PCR
IRC_739Rev	5' - AAA CCC GGG GAA GTC ATC TGC AGT GCT TTT TAC AT	Sekveneerimine ja koloonia PCR
IRC_677FWD	5' - GAT GAC AAG TGG CTA TGT GAG GC	Sekveneerimine

IRC_1332FWD	5'- CGC GGA TCC ATG GAA AAT GTA ACT GAA AGA AAT	Sekveneerimine
3'-NcoI-IRC3	5'- GCG CCA TGG TCA CTT TAT AAA AGA TCT TC	Δ28IRC3 geeni sisaldava konstrukti valmistamine
3'-NcoI-RecG	5'- GCA CCA TGG TTA CGC ATT CGA GTA ACG TTC -3'	RecG geeni sisaldava konstrukti valmistamine Inserdi konstrueerimine
5'-Sall-SD-Δ28IRC3	5'- ATA GTC GAC AGG AAG TAA ATA ATG TCA GCT CCC GTA CTC AGA G	Δ28IRC3 geeni sisaldava konstrukti valmistamine
5'-Sall-SD-RecG	5'- ATA GTC GAC AGG AAG AGT GCC ATG AAA GGT CGC CTG TTAG	RecG geeni sisaldava konstrukti valmistamine
pJBLacI tac 3' seq	5'- CCA GGC ATC AAA TTA AGC AG	Sekveneerimine
RecG_678FWD	5'- GCA ACG TCG TCT GAT TCT G	Sekveneerimine

2.4. Söötmed ja kasvutingimused

LB: (*Luria broth*) – 1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar (Bertani, 1951). Tardsöötmete tegemiseks lisati 1,7% agarit. LB vedel- ja tardsöötmele kasvanud DH5α ja rakud inkubeeriti 37 °C juures. Õigete kolooniate selekteerimiseks kasutati ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

2.5. Lahused ja reagentid

Tabel 4. Töös kasutatud lahused

Lahuse nimi	Koostis
RF1	100 mM KCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM kaaliumatsetaat; 10 mM CaCl ₂ ; 15% glütserool; pH 5.8
RF2	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% glütserool; pH 6.8

SOL 1	50mM glükoos; 25mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10mM EDTA (pH 8,0)
SOL 2	0,2M NaOH; 1% SDS
SOL 3	5M kaaliumatsetaat; 11,5% äädikhape; ddH ₂ O
T ₁₀ E ₁	Tris 10 mM; EDTA 1 mM; (pH 8)
10x Proteinaas K puhver	5% SDS; 50mM EDTA; 50mM TRIS
10xPCR	750 mM Tris-HCl; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1% TritonX (pH 8,8)
10xYellow puhver	750 mM Tris-HCl; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1% TritonX; 5% Ficoll 400; 10 mM Tartrasiin; (pH8,8)

2.6. *E. coli* BW25113 ja JW3627-1 tüvede kompetentsete rakkude valmistamine

Rakud kasvatati üleöö LB vedelsöötmees (+ 20mM MgCl₂). Hoiti jääl 10-15 min ning tsentrifuugiti 4 min 4000p/min 4 °C juures Hettich Universal 32R (rootor 1617 *swing out*) tsentrifuugiga põhja. Eemaldati sööde ning rakud resuspendeeriti jääkülmas 750 µl-s RF1 lahuses. Hoiti 10 min jääl ning rakud tsentrifuugiti põhja 4 min 4000p/min 4 °C juures. Eemaldati RF1 lahus ning lisati 250 µl RF2 lahust. Rakud alikvooditi 125 µl kaupa, külmutati vedellämmastikuga ning hoiti -80 °C juures. **Kogu protsess toimus +4 °C juures/ jääl.**

2.7. *E. coli* transformatsioon *kuumašokki* meetodiga

Kõik kolm tabelis 1. mainitud plasmidi paljundati *E. coli* DH5α rakkudes. Ühe transformatsiooni jaoks võeti 50 µl kompetentseid *E. coli* DH5α rake või 125 µl BW25113 ja JW3627 kompetentide puhul ning inkubeeriti jääl koos plasmiidiga 30 min, aeg-ajalt segades. Seejärel teostati kuumašokki 37 °C juures 2 min ja lisati 500 µl LB vedelsöödet. Rakke inkubeeriti 45 min 37 °C juures ja seejärel tsentrifuugiti 5 min 3500 p/min Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) põhja, eemaldati üleliigne sööde ja plaaditi 100 µl-t rakke selektiivsele LB Amp 100 µg/ml tardsöötmele ning kasvatati üleöö 37 °C juures.

2.8. Plasmiidse DNA eraldamine *E. coli*'st

Suuremahulise pJBLacl tac plasmidi puhastamise jaoks valiti tardsöötmele kasvavat vektorit sisaldavat DH5 α rakkude kolooniat ja kasvatati loksutil üleöö 37 °C juures 200 ml LB (+Amp 100 μ g/ml) vedelsöötmes.

Kultuur tsentrifuugiti põhja 50 ml tuubides 15 min 4000 p/min Hettich Mikro 200R (rootor 2424) tsentrifuugiga (järgnevaid samme tehti sama seadmega), sööde eemaldati ja sade lahustati 5 ml SOL 1's, segati ning jäeti jääle 10 minutiks jahtuma. Lisati 10 ml SOL 2 (2 mahtu SOL 1 ruumalast), segati ning inkubeeriti jääs 10 min. Lisati 7,5 ml SOL 3 (1,5 mahtu SOL 1 ruumalast), segati ning pöörates tuubi üles-alla ning inkubeeriti 10 minutit jääs. Seejärel tsentrifuugiti tuubid 20 min 5000p/min 4 °C juures. Supernatant kanti uute tuubidesse ja lisati 0,6 mahtu isopropanooli, inkubeeriti toatemperatuuril 20 min, seejärel tsentrifuugiti 20 min 5000 p/min toatemperatuuril. Eemaldati isopropanool ja lisati 5 ml 80% etanooli (EtOH) sademe pesemiseks ja lasti 5 min seisma. Tsentrifugiti 5 min 5000 p/min ning eemaldati etanool ja tsentrifuugiti korduvalt 2 min 5000 p/min etanooli jääkidest lahti saamiseks. Sade kuivatati lahtise korgiga ning lahustati 1 ml T₁₀E₁ lahuses. Lisati 1 μ l RnaasA-d (10 μ g/ml), segati ning inkubeeriti 65 °C juures 30 min. Seejärel lisati 2x proteinaas K puhver ja 1 μ l proteinaasi K (20 μ g/ml) ning inkubeeriti 65 °C juures 30 min.

Väiksemahulise plasmiidide pJBLacl- Δ 28IRC3 ja pJBLacl-*recG* puhastamist teostati FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit'iga vastavalt firma poolt välja töötatud protokollile.

2.9. DNA fenooltöötlus

DNA sisaldavale lahusele lisati 0,5 mahtu fenool/kloroformi segu (pH 7,5), segati ning hoiti toatemperatuuril 5 min vahepeal segades. Tsentrifugiti segu Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) 5 min 13400 p/min. Ülemine, DNA-t sisaldav faas, kanti uue mikrotsentrifuugi tuubi ja lisati 1/10 mahust 3M naatriumatsetaati (pH 7,0) ja 2,5 mahtu 96% EtOH. Inkubeeriti 20 min -20 °C juures ning tsentrifuugiti sadenenud DNA-t põhja 5 min 13400 p/min. Supernatant eemaldati, lisati 1ml 80% EtOH lahuse ja hoiti 5 min toatemperatuuril, seejärel eemaldati lahus, kuivatati 5 min toatemperatuuril ja sade lahustati seejärel T₁₀E₁-s ning säilitati -20 °C juures.

2.10. Geelektroforees ning DNA eraldamine geelist

DNA eraldamis- ja kloonimis-, restriksiooni- ning PCR produktid analüüsi agarosgeelektroforeesil. 0,8% agarosgeel (0,8% agaros; 40mM Trisatsetaat; 2mM EDTA pH 8,5; EtBr 0,5 µg/ml) voolutati TAE puhvris (40mM Trisatsetaat; 2mM EDTA pH 8,5).

DNA geelile kandmiseks kasutati 6x TAE laadimispuhvrit (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 60mM EDTA; 60% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine). DNA suurusmarkerina kasutati Solis BioDyne kommertsiaalmarkerit 1 kb DNA Ladder Ready to Load.

DNA visualiseerimiseks kasutati 260 nm juures Uvipro Gold masinat. Vajaliku DNA fragmenti sisaldav agarosgeeli ala lõigati välja. DNA eraldamiseks geelist kasutati FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit'i vastavalt firma poolt väljastatud protokollile.

2.11. Preparatiivne PCR

Kõik PCR reaktsioonid viidi läbi Biometra PCR'i masinas T1 Thermocycler.

Inserdide *recG* ja $\Delta 28IRC3$ konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks tehti 50µl PCR reaktsioonisegu, mis sisaldas 1x PCR puhvrit, 2,5mM MgSO₄, 0,2mM dNTP, praimerid 3'-NcoI-*RecG* ja 5'-Sall-SD-*RecG* (0,6 pmol/µl) *recG*-le ja praimerid 3'-NcoI-IRC3 ja 5'-Sall-SD- $\Delta 28IRC3$ (0,6 pmol/µl) $\Delta 28IRC3$ -le, ning PFU polümeraasi 0,08 U/µl (Biokeemia laboris puhastatud, Maie Loorits). Matriitsina kasutati *recG* jaoks *E. coli* genoomset DNA-t (50 ng) ja $\Delta 28IRC3$ inserdi jaoks *S.cerevisiae* genoomset DNA-t (50 ng) Reaktsioonisegu viidi õige ruumalani kasutades ddH₂O'd.

PCR programm: kuuma stardiga esimene kuumutamine 95°C 180 sek, seejärel 29x DNA denatureerimine 95°C 30 sek, praimerite kinnitumine 57°C 30 sek, DNA süntees 72°C 160 sek. Viimases tsükli, kus toimus DNA otste lõplik süntees, hoiti 72°C 600 sek. Pärast seda jahtutati segu 10 °C'ni.

PCR produkte kontrolliti 0,8% agarosgeelis.

2.12. Analüütiline PCR

Analüütiline PCR viidi läbi, et kontrollida *E. coli* DH5α kloonimise õnnestumist. Vektorit sisaldavate DH5α rakkude hulgast valiti kümme kolooniat ja tehti 10µl PCR reaktsioonisegu,

mis sisaldas 1x Yellow PCR puhver puhvrit, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,25 U/μl Taq (Biokeemia laboris puhastatud, Maie Loorits) polümeraasi, 3'-NcoI-RecG ja 5'-Sall-SD-RecG (0,5 pmol/μl) praimerid *recG* jaoks ja IRC_739Rev ja prtac (0,5 pmol/μl) Δ28IRC3 jaoks ning transformeeritud bakterirakke. Reaktsioonisegu viidi õige ruumalani ddH₂O'ga.

PCR programm: esimene kuumutamine 95°C 180 sek, seejärel 29x DNA denatureerimine 95°C 30 sek, praimerite kinnitumine 57°C 30 sek, DNA süntees 72°C 160 sek. Viimases tsüklis, kus toimus DNA otste lõplik süntees, hoiti 72°C 600 sek. Pärast seda jahututati segu 10 °C'ni

Amplifitseeritud produktid voolutati 0,8% agarosgeelis ning hinnati fragmentide suurus UV valguses.

2.13. Restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid

Vektorite konstrueerimiseks ja analüütiliseks kontrollimiseks teostati restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid, milles kasutati Thermo Fischer restriktase, T4 DNA ligaasi ja puhvreid.

Konstruktide loomiseks restrikteeriti peatükis 2.11 kirjeldatud puhastatud DNA fragmendid (*recG*, Δ28IRC3) ning plasmidi pJBLacI restriktasidega NcoI ja Sall. Restriktsioonisegu sisaldas 2xTango puhvrit, 1,5 μg eelnevalt puhastatud plasmiidset või amplifitseeritud DNA-d ning NcoI (0,5 U/μl) ja Sall (0,75 U/μl) ensüüme. Reaktsioonisegu ruumala viidi 20 μl-ni ddH₂O-ga.

Restriktsioonireaktsioon toimus 37 °C 2-3 h. Restrikteeritud DNA-t lahutati 0,8% agarosgeelil, vajaliku DNA-t sisaldava fragment lõigati agarosgeelist välja ning puhastati ja lahustati ddH₂O-s.

Ligeerimisel kasutati T4 ligaasi. Ligeerimiseks kasutatav restriktsioonisegu maht oli 10 μl ning koosnes 1x T4 ligaasi puhvrist, 0,5 U T4 ligaasist, 0,1 μg/μl BSA-st, restrikteeritud ja puhastatud plasmidist pJBLacI (150 ng) ja restrikteeritud ja puhastatud amplifitseeritud DNA fragmendist (*recG* 80 ng, Δ28IRC3 80 ng). Ligeerimisreaktsioon toimus toatemperatuuril 1h.

Analüütiline restriktsioonireaktsioon teostati pJBLacI-*recG*/Δ28IRC3 kloneerimise kontrollimiseks. Puhastatud plasmidi pJBLacI-*recG* lõigati EcoRI'ga (0,5 U/μl) 1x Tango

puhvril ja plasmidi pJBLacI- Δ 28IRC3 lõigati NcoI (0,5 U/ μ l) ja SalI (0,75 U/ μ l) ensüümidega. Reaktsioonisegude ruumalad viidi 20 μ l-ni ddH₂O-ga.

Saadud produktid voolutati 0,8% agarosgeelis ning UV valguses hinnati lõikunud fragmentide arvu ja suurust.

2.14. Erinevate *E.coli* tüvede UV tundlikkuse analüüs

Erinevate plasmiidsete konstruktidega transformeeritud rakke kasvatati loksutis üleöö 10 ml LB (+Amp 100 μ g/ml) vedelsöötmes, osadel katsetel Δ recG pJBLacI- Δ 28IRC3 kultuuri ekspressiooni indutseeriti 3 viimast tundi 1 mM IPTG-ga. Üleöö kultuuride optiline tihedus mõõdeti spektrofomeetriga 600 nm (edaspidi OD₆₀₀) juures ning seejärel lahjendati kõik kultuurid OD₆₀₀ 0,6. Saadud kultuurist tehti lahjenduste rida, kus algkultuuri (0,6) lahjendati 10-kordse sammuga vahemikus 10⁻¹ kuni 10⁻⁵. Plaadimiseks kasutati 10⁻⁵ lahjendatud kultuuri, mis andis 200-350 kolooniat Peetri tassi kohta. Peetri tasse kuivatati eelnevalt laminari all 10-15 min, et vältida üleliigset niiskust. Plaatimist teostati autoklaavitud klaaskuulidega LB Amp 100 μ g/ml tardsöötmele. Pärast plaatimist kiiritati osa tasse erinevate ultravioletti kiirguse intensiivsustega (5; 10; 20 J/m²) UVP CX-2000 UV Crosslinker seadmes ühe kaupa. Tasse inkubeeriti 20 h 37 °C juures. Seejärel arvutati tassidel üles kasvanud kolooniate arvu ning UV tundlikkust arvutati kui kiiritatud tassidel kasvanud kolooniate arvu ja referents tassidel kasvanud kolooniate arvu protsentuaalne suhe.

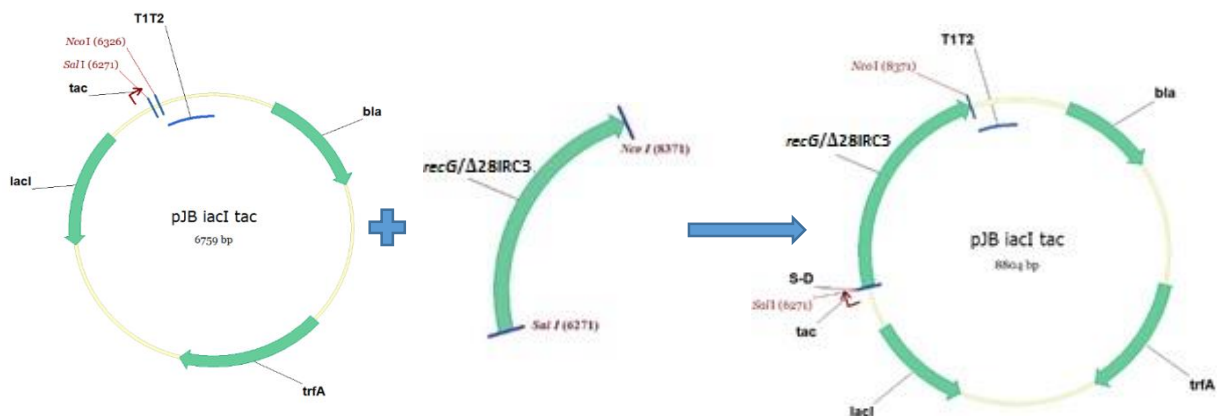
2.15. Erinevate *E.coli* tüvede mitomütsiin C tundlikkuse analüüs

Erinevate plasmiidsete konstruktidega transformeeritud rakke kasvatati loksutis üleöö 10 ml LB (+Amp 100 μ g/ml) vedelsöötmes, osadel katsetel Δ recG pJBLacI- Δ 28IRC3 kultuuri ekspressiooni indutseeriti 3 viimast tundi 1 mM IPTG-ga. Üleöö kultuuride optiline tihedus mõõdeti spektrofomeetriga 600 nm (edaspidi OD₆₀₀) juures ning seejärel lahjendati kõik kultuurid OD₆₀₀ 0,6. Saadud kultuurist tehti lahjenduste rida, kus algkultuuri (0,6) lahjendati 10-kordse sammuga vahemikus 10⁰ kuni 10⁻⁵. Igast lahjendusest külvati 5 μ l rakususpensiooni LB mitomütsiin C (MMC) 0,25 μ g/ml sisaldavale tardsöötmele ja kasvatati 20 h 37 °C juures. Elulemust hinnati visuaalselt.

3. TULEMUSED

3.1. Konstruktide valmistamine

Selleks, et uurida IRC3 võimet komplementeerida *E.coli* bakterirakus *recG* puudumist valmistati nimetatud geenidega konstruktid. Selleks kloneeriti plasmidi pJBLacI restriksioonisaitide Sall ja NcoI vahele, kas *recG* või $\Delta 28\text{IRC3}$ geeni sisaldavad inserdid (Joonis 11). $\Delta 28\text{IRC3}$ -s puuduvad 28 esimest N-terminaalset aminohappejääki ehk MTS, mis pärmis on vajalik selleks, et sihtida geeni produkt mitokondri maatriksisse. MTS on mitokondris ära lõigatud, mis teeb $\Delta 28\text{Irc3}$ versiooni valgu aktiivseks vormiks (Sedman et al., 2014).

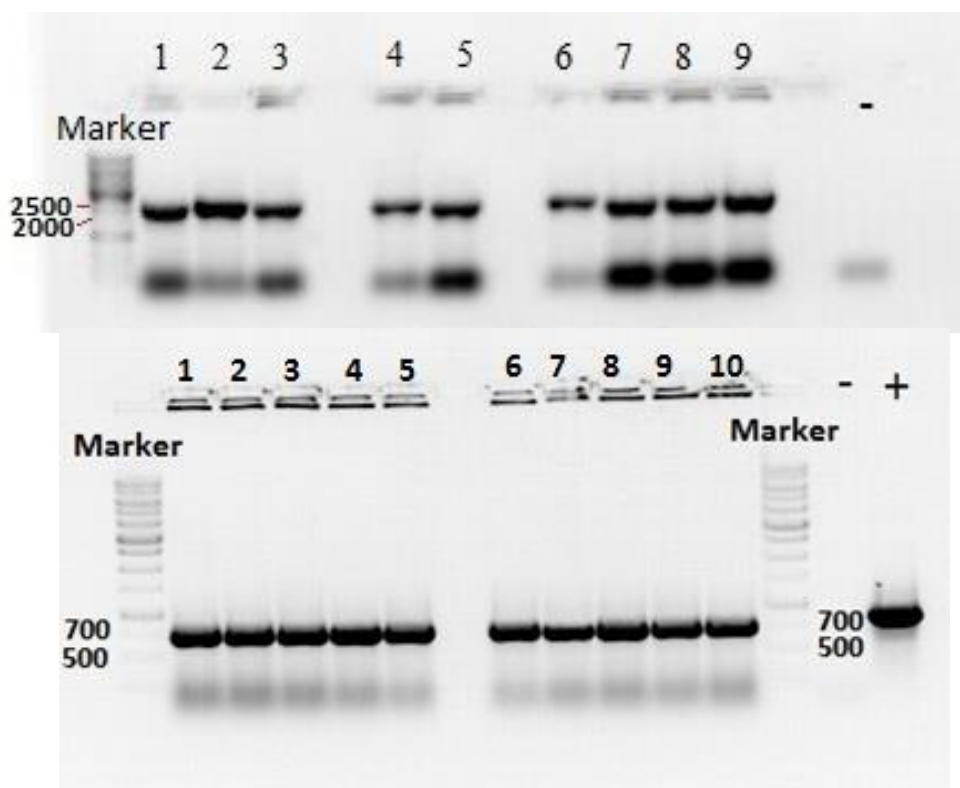


Joonis 11. Plasmidi pJBLacI-*recG*/ $\Delta 28\text{IRC3}$ valmistamise skeem. Joonisel on kujutatud vasakul plasmid pJBLacI tac inserdita ja paremal plasmid *recG*/ $\Delta 28\text{IRC3}$ geeniga (2106 ap/2013 ap), mis oli kloneeritud Sall ja NcoI restriksioonisaitide vahel (märgistatud punasena joonisel).

Plasmid pJBLacI tac on madala koopiarvuga, mis tähendab, et nimetatud plasmidi koopiat esineb rakus ligikaudu 10. See võimaldab vältida plasmiidilt ekspresseeritavate valkude üleekspressiooni.

Ligeerimisseguga transformeeriti *E. coli* DH5 α rakkudesse nagu on kirjeldatud peatükis 2.7. Üles kasvatatud *E. coli* DH5 α rakkudest valiti mitu kolooniat igast tassist ja kontrolliti geenide olemasolu PCR abil (peatükk 2.12). Kui kloneerimine õnnestus, siis PCR tulemusel pidi amplifitseeruma fragment, mis sisaldaks inserdi (*recG* puhul) või osa inserdist plasmiidiga ($\Delta 28\text{IRC3}$ puhul), mis näitaks, et rakkudes on suure tõenäosusega õiget inserti sisaldavad plasmiidid (Joonis 12).

Kuna kõik kolooniad andsid positiivse tulemuse siis nende hulgast valiti 3 kolooniad ja eraldati nendest plasmiidne DNA (peatükk 2.8). Inseti olemasolu kontrolliti lisaks restriksioonanalüüsi abil.



Joonis 12. Koloonia PCR'i tulemused. Ülemisel joonisel kontrolliti kloneerimise õnnestumist plasmiidil pJBLacl-*recG*. Antud meetodiga amplifitseeriti 2106 bp fragmenti. Alumisel joonisel on näha kloneerimise õnnestumist plasmiidil pJBLacl- Δ 28IRC3, kus pidi amplifitseeruma 754 bp suurusega fragment. Joonisel on näidatud DNA markeri suurused millega olid võrreldud amplifitseeritud fragmendid. Kloonid on tähistatud numbritega. Negatiivne kontroll on märgistatud miinus ja positiivne pluss märgiga. Reaktsiooni positiivseks kontrolliks oli kasutatud varem valmistatud IRC3 geeni järjestuse sisaldav valgu ekspressiooni plasmidi.

Valmistatud konstrukte kloneerimise õigsuse kontrollimiseks saadeti konstruktid TÜMRI tuumiklaborisse sekveneerimisele, sekveneerimine kinnitas, et konstruktid on kloneeritud õigesti.

3.2. UV mõju uurimine erinevate *E. coli* bakteritüvede elulemusele

Eelnevalt oli teada, et *recG* inaktiveerimine rakus põhjustab tundlikkust ultraviolett kiirgusele (Lloyd ja Buckman, 1991; Lloyd, 1991). Põhinedes sellele teadmisele otsustati kontrollida, kas *Irc3* sisseviimine soodustab elulemuse $\Delta recG$ rakkudes.

UV kiirgus põhjustab tümiin dimeeride moodustumist ning mida pikem on UV-valguse toime, seda rohkem tümiin dimeere moodustub DNA-s.

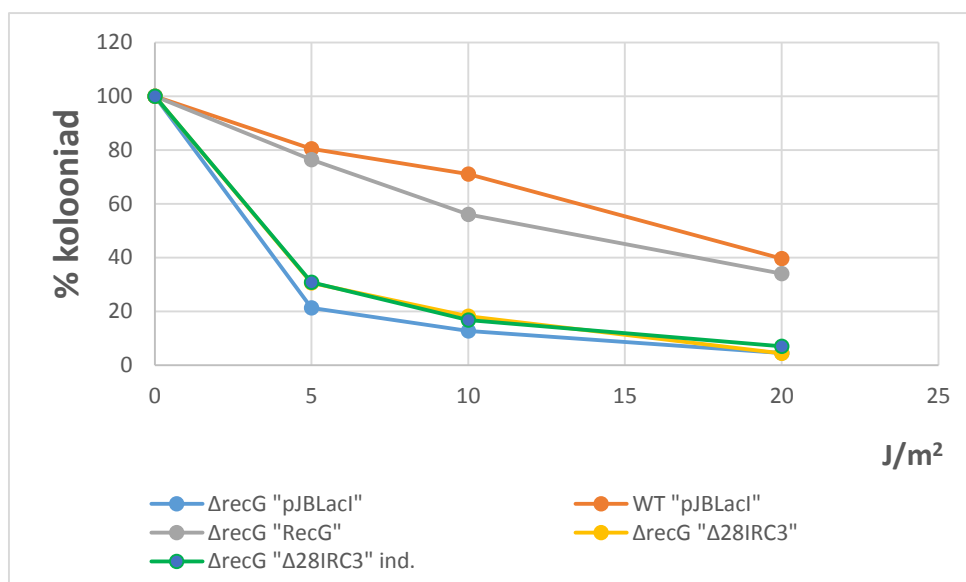
Uuritavad bakteritüved BW25113 (*wt*) ja JW3627-1 ($\Delta recG$) transformeeriti saadud konstruktidega. *wt* transformeeriti pJBLacl originaal plasmiidiga selleks, et kasutada selle positiivse kontrollina. $\Delta recG$ tüvi oli transformeeritud pJBLacl *tac*, pJBLacl-*recG* ja pJBLacl- $\Delta 28IRC3$ plasmiididega. $\Delta recG$ pJBLacl tüve kasutati negatiivse kontrollina. $\Delta recG$ pJBLacl-*recG* tüvi oli plasmidi positiivne kontroll, kuna plasmidi peal olev *recG* koopia pidi taastama *wt* fenotüübi ehk pidi viima antud tüve UV-tundlikkust *wt* tüvega sarnasele tasemele. $\Delta recG$ pJBLacl- $\Delta 28IRC3$ tüve kasutati *Irc3* komplementatsiooni võimekuse hindamiseks.

Transformeeritud rakud plaaditi ja kiiritati nagu kirjeldatud peatükis 2.14. Kuna plasmiid pJBLacl on madala koopia arvuga, siis indutseeriti $\Delta 28IRC3$ konstrukti IPTG-ga 3 h enne plaadimist, et vaadata kas komplementatsiooni taset mõjutab *Irc3* valgu võimendatud ekspressioon.

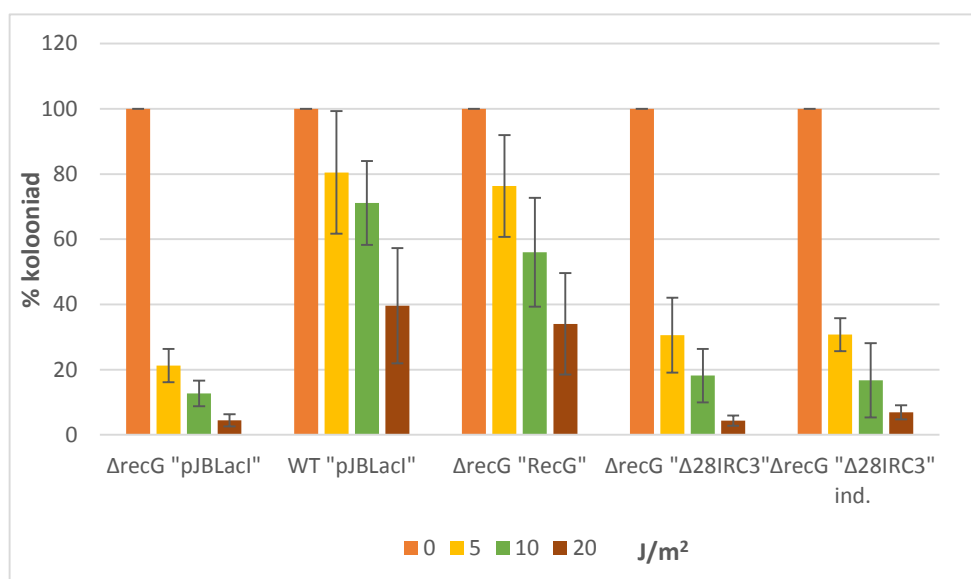
Eelkatsetes prooviti erinevaid IPTG kontsentratsioone ja kiiritamise intensiivsused. Optimeerimise tulemusel valiti 3 erinevat kiirguse doosi ning induktori lisamine ei parandanud rakkude elulemust pärast kiiritamist.

Katset tehti vähemalt kolmes korduses. Kuna kolooniate arv ja elulemuse protsent sama tüve ja sama kiiritamise juures oli kergelt erinev, siis võeti nendest arvudest aritmeetiline keskmine. Kolooniate arvutamisel kiiritamata tassidel elulemuseks võeti 100%, sellest tuginedes arvutati kiiritatud tassidel bakterite elulemuse protsent.

Katsete tulemused näitasid, et *Irc3* on võimeline osaliselt komplementeerima *recG* deletsiooni bakteriaalses tüves (Joonis 13A, 13B) UV doosidel 5 ja 10 J/m². *recG* koopia taastas UV tundlikkust *wt* tasemeni $\Delta recG$ -s, pJBLacl plasmiidiga $\Delta recG$ rakkude elulemus oli madalam võrreldes *wt* ja $\Delta recG+recG$, näidates, et katse kontrollid töötasid (Lisa: Tabel 5).



Joonis 13A. Uuritavate bakteritüvede elulemus erinevate UV intensiivsuste juures. Y-telg näitab kultuuri keskmise elulemuse protsenti ja x-telg näitab rakendatud UV kiirguse intensiivsust J/m². Kõige ülemine oranž joon on wt, hall joon on ΔrecG pJBLacI-recG. Nagu on näha ΔrecG pJBLacI-recG viib elulemuse wt rakkude tasemeni ja ΔrecG pJBLacI-Δ28IRC3 on võimeline taastama wt fenotüübi ainult osaliselt.



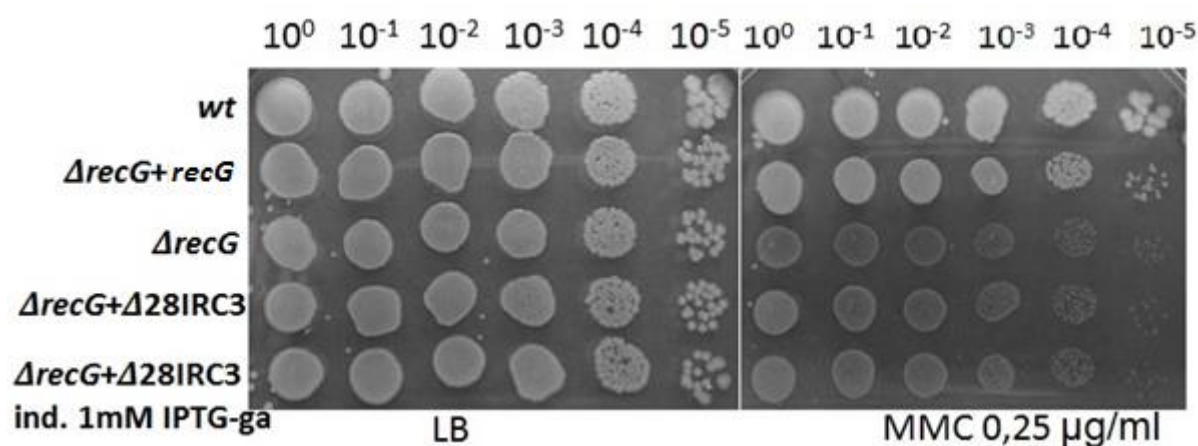
Joonis 13B. Uuritavate bakteritüvede elulemus erinevate UV dooside juures. Joonise 13A andmed on väljendatud diagrammina. Tulpade kõrgus peegeldab kultuuri keskmist elulemust protsentides. Värvidega on näidatud rakendatud UV kiirguse intensiivsust J/m². Oranž kiiritama, kollane 5 J/m², roheline 10 J/m², pruun 20 J/m². Standartvigade ülemine ja alumine piir on märgitud musta joonega tulpade peal.

3.3. Mitomütsiini C mõju uurimine *E. coli* bakteritüvede elulemusele

Kuna *recG* inaktiveerimine põhjustab rakus tundlikkust nii ultravioletti kiirgusele kui ka DNA kahjustavale agendile mitomütsiini C-le (Lloyd ja Buckman, 1991; Lloyd, 1991), seetõttu otsustati kontrollida, Irc3 efekti $\Delta recG$ elulemusele ka selle toksiini juuresolekul. Mitomütsiini C põhjustab ristsiirdeid DNA-s ja kaheaahelalisi DNA katkeid.

Mitomütsiini C mõju rakkude elulemusele kontrolliti *spot* testiga. Katse teostati 2 korduses nagu on kirjeldatud peatükis 2.15. Rakud külvati LB agarsöötmele ja mitomütsiini C sisaldavale LB söötmetele raku hulga kontrollimiseks ja elulemuse võrdlemiseks. Eelkatsete tulemusel selgus, et mitomütsiini C madalal kontsentratsioonil 0,1 $\mu\text{g/ml}$ erinevust ei olnud näha ning suurel 0,5 $\mu\text{g/ml}$ oli liiga suur mõju ja elujäänud rakkude hulk oli liiga madal. Seetõttu otsustati kasutada vahepealset mitomütsiini C kontsentratsiooni 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Irc3 valguga ekspressiooni suurenemiseks indutseeriti osa kultuuridest 1mM IPTG-ga.

Söötmele pipeteeriti statsionaarse faasi bakterikultuuride 10-kordsed lahjendusread 5 μl kaupa. Algekultuurina võeti rakukultuuri mille OD_{600} oli 0,6. Sama katse oli korratud ka ekspotentsiaalses faasis kasvanud kultuuriga, kuid erinevust ei olnud märgatud.



Joonis 14. Mitomütsiini C mõju IRC3 geeniga rakkudele. Vasakul on võrdluseks toodud toksiinita LB tardsöötme peal bakterikultuuride elulemus näitamaks, et erinevate tüvede toksiinita rakukultuuride kasvus erinevust ei olnud ning kõigis katsetes oli võrdne kogus rakke. Paremal on mitomütsiini C-ga kasvatatud rakud. Söötmele on pipeteeritud statsionaarse faasi bakterikultuuride 10-kordsed lahjendusread (märgitud üleval) 5 μl kaupa, kus 10^0 , on kultuur mille OD_{600} on 0,6.

Katsete tulemustest selgus, et Irc3p tõstab rakkude elulemust mitomütsiin C sisaldaval söötmel (Joonis 14), kinnitades et Irc3p on võimeline osaliselt komplementeerima *recG* puudumist. *recG* koopia taastas *wt* fenotüüpi $\Delta recG$ -s, algplasmiidiga $\Delta recG$ elulemus oli madalam võrreldes *wt* ja $\Delta recG+recG$, näidates, et katse kontrollid töötasid. 1mM IPTG lisamine ei mõjutanud kuidagi elulemust ning samuti ei olnud näha elulemuses erinevust statsionaarse ja eksponententsiaalses faasis olevate rakkude vahel (andmed ei ole esitatud).

4. ARUTELU

Antud töö eesmärgiks oli kontrollida, kas *S. cerevisiae* IRC3 geen komplementeerib *E. coli* *recG* geeni puudumist bakterirakkudes. Selleks konstrueeriti vastavaid geene sisaldavaid plasmide ja transformeeriti neid uuritavatesse bakteritüvedesse. Seejärel kontrolliti nende elulemust stressitingimustes, mis olid põhjustatud ultravioletti kiirgusest või mitomütsiin C-st.

Katsed näitasid, et Irc3p ekspressioon $\Delta recG$ tüves tõstab rakkude elulemust UV-ga töödeldud rakkudes ning mitomütsiin C sisaldaval söötmel võrreldes $\Delta recG$ tüvega, kinnitades Irc3p võimet osaliselt komplementeerida RecG puudumist. *recG* geeni koopiat taastas *wt* fenotüüpi $\Delta recG$ tüves, algplasmiidiga $\Delta recG$ elulemus oli madalam võrreldes *wt* ja $\Delta recG+recG$, näidates katse kontrollid töötasid nagu eeldatud oli.

UV-ga kiiritatud kontroll tüvede elulemus langeb kokku varem Lloyd ja Buckman'i (Lloyd ja Buckman, 1991) poolt teostatud eksperimentidega, kinnitades katse läbiviimise korrektsust.

Irc3 on *S. cerevisiae* mitokondrites leiduv helikaas, mis on oluline mitokondriaalse genoomi stabiilsuse säilitamiseks metsiktüüpi p^+ rakkudes. Arvatakse, et Irc3 võib osaleda dsDNA katkete reparatsioonis rekombinatsiooni mehhanismide abil protsessides selleks seiskunud replikatsiooni kahvleid.

Bakteriaalne RecG helikaas on seotud homoloogilise rekombinatsiooniga ja DNA reparatsiooniga rakus. RecG regresseerib replikatsiooni kahvleid ning stabiliseerib dsDNA katkete parandamise ajal tekkinud struktuure.

Komplementatsiooni katsed *irc3Δ* pärmi tüvedes näitasid, et mitokondrisse suunatud RecG osaliselt parandas *irc3Δ* pärmirakkude kasvu glütseroolil. RecG stabiliseeris funktsionaalse mitokondriaalse genoomi *irc3Δ* tüvedes suutes kas või osaliselt täita Irc3p rolli pärmi mitokondris (Gaidutšik et al., 2016). *E. coli* RecG asendati ka tema homoloogidega teistes organismides näiteks *Helicobacter pylori*'s RecG homoloogiga ning taimede mitokondrites ja kloroplastides lokaliseeruva RECG-ga. Antud töödes *recG* komplementeeris nende geenide deletsiooni ainult osaliselt (Odahara et al., 2015; Wallet et al., 2015; Kang et al., 2004). See näitab, et erinevate RecG homoloogide käitumine oleneb uuritavate organismide taustast või spetsiifikast.

Võimalusi, miks Irc3 komplementeerib RecG-t ainult osaliselt võib olla mitu:

1. Erinevused struktuuris. Valgud kuuluvad ühte superperekonda aga erinevatesse perekondadesse ning funktsioneerivad erinevates organismides. RecG N-terminuses on lisa *wedge* domeen ja C-terminuses on helikaasne domeen. Vastukaaluks on Irc3 valgul lisa domeen C-terminuses (CTE) ja helikaasne domeen N-terminuses. Ka ei tasu unustada, et Irc3 on pärmi mitokondriaalne helikaas ja RecG on bakteriaalne helikaas.
2. Erinevad substraadid. Samuti on substraati spetsiifilisus neil valkudel natuke erinev, Irc3p harutab lahti replikatsiooni kahvli-laadseid substraate milles kas juhtiv või mahajääv ahel puuduvad, samas RecG eelistab kahvlilaadseid substraate mahajääva ahelaga. Irc3 helikaasil pole lahti harutamise aktiivsust lineaarsetel osaliselt kaheaheelalisel DNA peal ja ssDNA ei stimuleeri Irc3 aktiivsust. Seevastu bakteriaalne RecG harutab lahti lühikesi dsDNA molekule. Seega võivad olla erinevused valkude mehhanismides. Reaktsiooni läbiviimise kiirus võib olla neil valkudel erinev, kuna Irc3 on eukarüootne valk, ta võib olla lihtsalt aeglasem võrreldes RecG-ga ning ei ole võimeline kõiki vigu parandama.
3. Abivalkude olemasolu. Et saada ligipääsu replikatsiooni kahvli peale interakteerub RecG SSB valguga. (Bianco ja Lyubchenko, 2017). Informatsioon Irc3 ja SSB interaktsiooni kohta puudub.

Ei saa vältida võimalust, et Irc3p biokeemilised funktsioonid sarnanevad paremini teiste bakterites leiduvate valkudega nagu näiteks RecQ ja RuvAB või hoopis mõne kõrgemates eukarüootides leiduva valguga nagu näiteks SMARCAL1 (Azeroglu ja Leach, 2017).

KOKKUVÕTE

Helikaase leidub kõikides elu domeenides ning nad osalevad erinevates raku metabolismi võtmeprotsessides nagu DNA reparatsioon, replikatsioon, rekombinatsioon ja valgu süntees. Helikaasid on võimelised lahti harutama DNA ja RNA duplekse, kasutades selleks NTP hüdrolyüsil saadud energiat, tehes dupleksi kättesaadavamaks teiste valkudele edasisteks manipulatsioonideks.

Mitokondrites ning kloroplastides leidub ka helikaase. Irc3 helikaas on hiljuti avastatud pärmi mitokondris lokaliseeruv ning mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamiseks vajalik valk. On pakutud, et Irc3 võiks täita sarnast bioloogilist rolli nagu bakteriaalne RecG valk. Bakteriaalne RecG on genoomi reparatsiooni ning replikatsiooni mehhanismides osalev tuumas lokaliseeruv valk.

Töö praktilises osas uuriti *S.cerevisiae* Irc3 võimet komplementeerida bakteriaalse *recG* deletsiooni *E. coli* rakus. Selleks konstrueeriti plasmiidid vastavate geenidega ning transformeeriti neid uuritavatesse *E. coli* tüvedesse. Seejärel võrreldi nende tüvede UV-kiirguse taluvust ning rakkude tundlikkust DNA-d kahjustavale kemikaalile mitomütsiin C.

Tulemused näitasid, et Irc3p osaliselt komplementeeris RecG puudumist UV doosidel 5 ja 10 J/m² ning mitomütsiini C sisaldaval tardsöötmel. *recG* geeni koopia taastas *wt* fenotüüpi $\Delta recG$ tüves, algplasmiidiga $\Delta recG$ elulemus oli madalam võrreldes *wt* ja $\Delta recG+recG$, näidates katse läbiviimise korrektsust. UV-ga kiiritatud kontroll tüvede elulemus langes kokku Lloyd ja Buckman'i (Lloyd ja Buckman, 1991) poolt teostatud eksperimentidega, kinnitades, katse läbiviimise õigsust.

Osaline komplementatsioon võib olla põhjustatud sellest, et RecG ja Irc3 valgud töötavad erinevas bioloogilises kontekstis, omavad mõned substraati spetsiifilisuse erinevused ning valkude struktuurne erinevus võiks samuti olla osalise komplementatsiooni põhjuseks. Võimalik, et teised prokarüootide või eukarüootide helikaasid Irc3p-ga sarnaste bioloogiliste omadustega ning struktuuriga näitaksid kõrgema komplementatsiooni taseme.

Complimentation analysis of *E. coli* *recG* gene deletion with *S. cerevisiae* IRC3

Arina Šablinskaja

SUMMARY

Helicases present in all domains of life where they are involved in various essential cellular processes such as DNA repair, replication, recombination, and protein synthesis. Helicases are capable to unwind DNA and RNA duplexes, using energy derived from the hydrolysis of NTP to make nuclein acid accessible to other proteins for further manipulations. Helicases are also found in mitochondria and chloroplasts. Irc3 is a recently discovered yeast mitochondrial DNA helicase required to maintain mitochondrial DNA stability. It has been suggested that Irc3 could fullfill similar biological role as the bacterial RecG protein. RecG is a nuclear protein, which is involved in genome maintenance via recombination repair mechanisms.

In practical part of this work has been investigated *S.cerevisiae* Irc3 ability to complement a deletion of the bacterial *recG* in *E. coli* cell. For this purpose, plasmids with corresponding genes were constructed and transformed into appropriate *E. coli* strains. Then the sensitivity of the different *E. coli* strains to UV irradiation and DNA-damaging chemical mitomycin C was compared.

The results showed that Irc3p partially complements RecG deficiency at UV doses of 5 and 10 J/m², and on mitomycin C containing solid media. *recG* gene copy in deficient strain restored *wt* tolerance to damaging agents, original plasmid containing $\Delta recG$ survival level was lower in comparison to *wt* and $\Delta recG+recG$, showing that the experiment was conducted correctly. UV-irradiated control strains survival was on comparable level with Lloyd and Buckman (Buckman and Lloyd, 1991) carried experiments, confirming the accuracy of performed experiments.

Partial complementation may be due to the fact that RecG and Irc3 proteins operate in different bioological context, minor differences in substrate specificity and structural difference in proteins could also be the reason of the partial complementation. It is possible that other prokaryotic or eukaryotic helicases that better reflect Irc3p biological role could give better level of complementation.

KIRJANDUSE LOETELU

Azeroglu, B., & Leach, D. (2017). RecG Controls DNA Amplification at Double-Strand Breaks and Arrested Replication Forks. *FEBS letters*.

Azeroglu, B., Mawer, J. S., Cockram, C. A., White, M. A., Hasan, A. M., Filatenkova, M., & Leach, D. R. (2016). RecG directs DNA synthesis during double-strand break repair. *PLoS Genet*, 12(2): e1005799.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... & Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1).

Bernardi, G. (2005). Lessons from a small, dispensable genome: the mitochondrial genome of yeast. *Gene*, 354, 189-200.

Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol*. 62: 293-300.

Bianco, P. R. (2010). DNA helicases. *eLS*.

Bianco, P. R. (2015). I came to a fork in the DNA and there was RecG. *Progress in biophysics and molecular biology*, 117(2): 166-173.

Bianco, P. R., & Lyubchenko, Y. L. (2017). SSB and the RecG DNA helicase: An intimate association to rescue a stalled replication fork. *Protein Science*.

Butow, R. A., Perlman, P. S., & Grossman, L. I. (1985). The unusual var1 gene of yeast mitochondrial DNA. *Science*, 228: 1496-1502.

Byrd, A. K., & Raney, K. D. (2012). Superfamily 2 helicases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17: 2070–2088.

Carles-Kinch, K., George, J. W., & Kreuzer, K. N. (1997). Bacteriophage T4 UvsW protein is a helicase involved in recombination, repair and the regulation of DNA replication origins. *The EMBO Journal*, 16(13): 4142-4151.

- Chen, X. J., & Butow, R. A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Reviews Genetics*, 6(11): 815-825.
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P., & Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current opinion in structural biology*, 20(3): 313-324.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 440(3): 325-331.
- Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S., & Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Scientific reports*, 6: 26414.
- Gorbalenya, A. E., & Koonin, E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current opinion in structural biology*, 3(3): 419-429.
- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 43 166: 557-580
- Hollingsworth, M. J., & Martin, N. C. (1986). RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Molecular and cellular biology*, 6(4): 1058-1064.
- Kang, J., Tavakoli, D., Tschumi, A., Aras, R. A., & Blaser, M. J. (2004). Effect of host species on recG phenotypes in *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(22), 7704-7713.
- Lipinski, K. A., Kaniak-Golik, A., & Golik, P. (2010). Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome—from genetics to evolution and systems biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6): 1086-1098.
- Lloyd, R. G. (1991). Conjugational recombination in resolvase-deficient *ruvC* mutants of *Escherichia coli* K-12 depends on recG. *Journal of bacteriology*, 173(17): 5414-5418.
- Lloyd, R. G., & Buckman, C. A. R. O. L. (1991). Genetic analysis of the recG locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *Journal of bacteriology*, 173(3): 1004-1011.

- Lloyd, R. G., & Rudolph, C. J. (2016). 25 years on and no end in sight: a perspective on the role of RecG protein. *Current genetics*, 62(4): 827-840.
- Long, D. T., & Kreuzer, K. N. (2009). Fork regression is an active helicase-driven pathway in bacteriophage T4. *EMBO reports*, 10(4): 394-399.
- Machius, M., Henry, L., Palnitkar, M., & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the DNA nucleotide excision repair enzyme UvrB from *Thermus thermophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(21): 11717-11722.
- Mackintosh, S. G., & Raney, K. D. (2006). DNA unwinding and protein displacement by superfamily 1 and superfamily 2 helicases. *Nucleic acids research*, 34(15): 4154-4159.
- Mackintosh, S. G., & Raney, K. D. (2006). DNA unwinding and protein displacement by superfamily 1 and superfamily 2 helicases. *Nucleic acids research*, 34(15): 4154-4159.
- Mahdi, A. A., Briggs, G. S., Sharples, G. J., Wen, Q., & Lloyd, R. G. (2003). A model for dsDNA translocation revealed by a structural motif common to RecG and Mfd proteins. *The EMBO journal*, 22(3): 724-734.
- Manosas, M., Perumal, S. K., Bianco, P. R., Ritort, F., Benkovic, S. J., & Croquette, V. (2013). RecG and UvsW catalyze robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. *Nature communications*, 4, 2368.
- Manosas, M., Xi, X. G., Bensimon, D., & Croquette, V. (2010). Active and passive mechanisms of helicases. *Nucleic acids research*, gkq273. Vol(nr) 38(16): 5518–5526
- Marians, K. J. (2000). PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends in biochemical sciences*, 25(4), 185-189.
- Mason, T. L., Pan, C., Sanchirico, M. E., & Sirum-Connolly, K. (1996). Molecular genetics of the peptidyl transferase center and the unusual Var1 protein in yeast mitochondrial ribosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 52(12): 1148-1157.
- Nelson, S. W., & Benkovic, S. J. (2007). The T4 phage UvsW protein contains both DNA unwinding and strand annealing activities. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1): 407-416.

- Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., & Sekine, Y. (2015). RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing extensive recombination between short dispersed repeats. *PLoS Genet*, *11*(3): e1005080.
- Patel, S. S., & Donmez, I. (2006). Mechanisms of helicases. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(27): 18265-18268.
- Rudolph, C. J., Upton, A. L., Briggs, G. S., & Lloyd, R. G. (2010). Is RecG a general guardian of the bacterial genome?. *DNA repair*, *9*(3): 210-223.
- Schmidt, O., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(9): 655-667.
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., & Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic acids research*, *42*(21): 13214-13227.
- Seraphin, B., Simon, M., & Faye, G. (1987). The mitochondrial reading frame RF3 is a functional gene in *Saccharomyces uvarum*. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(21): 10146-10153.
- Singleton, M. R., & Wigley, D. B. (2002). Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *Journal of bacteriology*, *184*(7): 1819-1826.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., & Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.*, *76*: 23-50.
- Singleton, M. R., Scaife, S., & Wigley, D. B. (2001). Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell*, *107*: 79-89.
- Theis, K., Chen, P. J., Skorvaga, M., Van Houten, B., & Kisker, C. (1999). Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *The EMBO journal*, *18*(24): 6899-6907.

Wallet, C., Le Ret, M., Bergdoll, M., Bichara, M., Dietrich, A., & Gualberto, J. M. (2015). The RECG1 DNA translocase is a key factor in recombination surveillance, repair, and segregation of the mitochondrial DNA in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(10): 2907-2925.

West, S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annual review of genetics*, 31(1), 213-244.

Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature Reviews Genetics*, 3(6): 475-481.

Raamatud

Jankowsky, E. & Fairman-Williams, M. E. 2010. An Introduction to RNA Helicases: Superfamilies, Families, and Major Themes, p. 1-31 In E. Jankowsky (ed.), *RNA helicases*.

Raney K. D., Byrd A. K., & Aarattuthodiyil S. 2012. Structure and Mechanisms of SF1 DNA Helicases, p. 17-25, 29, 33. In M. Spies (ed.), *DNA helicases and DNA motor proteins*, Vol. 973. Springer Science & Business Media.

Wu C. G. & Spies, M. 2012. What Are Helicases?, p. 4-5. In M. Spies (ed.), *DNA helicases and DNA motor proteins*, Vol. 973. Springer Science & Business Media.

LISAD

Tabel 5. Kolooniade loendus ja arvutuskäik UV-ga kiiritatud tassidel					
loenduse nr	Genotüüp	0	5	10	20
1	ΔRecG "-"	369	58	35	123
	WT "-"	227	253	193	115
	ΔRecG "recG"	295	275	156	130
	ΔRecG "Δ28IRC3"	331	109	51	175
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	187	47	29	184
2	ΔRecG "-"	342	95	34	82
	WT "-"	203	181	112	75
	ΔRecG "recG"	328	243	124	152
	ΔRecG "Δ28IRC3"	270	96	45	156
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	285	80	37	121
3	ΔRecG "-"	390	87	63	180
	WT "-"	330	180	240	180
	ΔRecG "recG"	297	272	180	100
	ΔRecG "Δ28IRC3"	228	117	71	136
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	137	51	50	110
4	ΔRecG "-"	306	49	57	253
	WT "-"	450	360	356	292
	ΔRecG "recG"	343	236	234	127
	ΔRecG "Δ28IRC3"	300	81	59	123
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	306	87	29	206
5	ΔRecG "-"	370	64	29	130
	WT "-"	480	355	300	149
	ΔRecG "recG"	343	309	285	176
	ΔRecG "Δ28IRC3"	241	74	62	118
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	276	96	25	158
6	ΔRecG "-"	630	174	90	315
	WT "-"	630	570	540	1280
	ΔRecG "recG"	480	300	171	630
	ΔRecG "Δ28IRC3"	235	49	27	70
7	ΔRecG "-"	570	125	72	248
	WT "-"	680	434	390	1280
	ΔRecG "recG"	420	227	226	540
	ΔRecG "Δ28IRC3"	298	47	21	47
Suhe protsentides					
1	ΔRecG "-"	100	15,71816	9,485095	3,333333
	WT "-"	100	111,4537	85,02203	50,66079
	ΔRecG "recG"	100	93,22034	52,88136	44,0678
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	32,93051	15,40785	5,287009
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	100	25,13369	15,50802	9,839572
2	ΔRecG "-"	100	27,77778	9,94152	2,397661

	WT "-"	100	89,16256	55,17241	36,94581
	ΔRecG "recG"	100	74,08537	37,80488	46,34146
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	35,55556	16,66667	5,777778
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	100	28,07018	12,98246	4,245614
3	ΔRecG "-"	100	22,30769	16,15385	4,615385
	WT "-"	100	54,54545	72,72727	54,54545
	ΔRecG "recG"	100	91,58249	60,60606	33,67003
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	51,31579	31,14035	5,964912
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	100	37,22628	36,49635	8,029197
4	ΔRecG "-"	100	16,01307	18,62745	8,267974
	WT "-"	100	80	79,11111	64,88889
	ΔRecG "recG"	100	68,80466	68,22157	37,02624
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	27	19,66667	4,1
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	100	28,43137	9,477124	6,732026
5	ΔRecG "-"	100	17,2973	7,837838	3,513514
	WT "-"	100	73,95833	62,5	31,04167
	ΔRecG "recG"	100	90,08746	83,09038	51,31195
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	30,70539	25,72614	4,896266
	ΔRecG "Δ28IRC3" ind 1	100	34,78261	9,057971	5,724638
6	ΔRecG "-"	100	27,61905	14,28571	5
	WT "-"	100	90,47619	85,71429	20,31746
	ΔRecG "recG"	100	62,5	35,625	13,125
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	20,85106	11,48936	2,978723
7	ΔRecG "-"	100	21,92982	12,63158	4,350877
	WT "-"	100	63,82353	57,35294	18,82353
	ΔRecG "recG"	100	54,04762	53,80952	12,85714
	ΔRecG "Δ28IRC3"	100	15,77181	7,04698	1,577181
	Protsentides keskmine				
	ΔrecG "pJBLacI"	100	21,23755	12,70901	4,496963
	WT "pJBLacI"	100	80,48854	71,08572	39,60337
	ΔrecG "RecG"	100	76,33256	56,00554	34,05709
	ΔrecG "Δ28IRC3"	100	30,59002	18,16343	4,368838
	ΔrecG "Δ28IRC3" ind.	100	30,72882	16,70438	6,914209
	Standarthälbe				
	ΔrecG "pJBLacI"	0	5,138207	3,898029	1,881365
	WT "pJBLacI"	0	18,83031	12,85077	17,64938
	ΔrecG "RecG"	0	15,58114	16,65932	15,52099
	ΔrecG "Δ28IRC3"	0	11,45295	8,224019	1,604775
	ΔrecG "Δ28IRC3" ind.	0	5,05723	11,37659	2,143048

* Tabeli andmete arvutuskäik: kolooniad loendati ning arvutati suhted protsentides. Seejärel arvutati suhete keskväärtused ning standardhälve.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Arina Šablinskaja (sünnikuupäev: 6.mai 1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

E.coli RecG geeni komplementeerimise analüüs *S. cerevisiae* IRC3 geeniga,

mille juhendaja on M.Sc Ilja Gaidutšik,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2017